

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE VETERINARIA DE LUGO



**“MAEDI VISNA EN EL GANADO OVINO DE
CARNE DE GALICIA: ANÁLISIS DE FACTORES
DE RIESGO COMO APROXIMACIÓN A SU
CONTROL”**

Memoria presentada por la Licenciada en
Veterinaria **Dña. Noelia Lago
Rodríguez** para optar al grado de Doctor.

Lugo, agosto de 2012



UNIVERSIDADE DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA

Departamento de Patoloxía Animal
Facultad de Veterinaria
Campus Universitario, s/n.
27002 LUGO (España)
Tfno. 982 252 231 – 982 223 996
Fax 982 252 195

D. GONZALO FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, Profesor Titular del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela,

D. PABLO DÍAZ FERNÁNDEZ, Profesor Ayudante Doctor del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **“MAEDI VISNA EN EL GANADO OVINO DE CARNE DE GALICIA: ANÁLISIS DE FACTORES DE RIESGO COMO APROXIMACIÓN A SU CONTROL”**, que presenta Dña. NOELIA LAGO RODRÍGUEZ para optar al Título de Doctor en Veterinaria, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de los abajo firmantes, y en su opinión, reúne las condiciones legales precisas.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman en Lugo, a 3 de agosto de 2012.

Gonzalo Fernández

Pablo Díaz

PUBLICACIONES

Parte de los resultados obtenidos en el desarrollo de esta Tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

A.- Artículos de investigación:

1.- **LAGO N.**, LÓPEZ C., PANADERO R., CIENFUEGOS S., PATO F.J., PRIETO A., DÍAZ P., MOURAZOS N., FERNÁNDEZ G. 2011. Seroprevalence and risk factors associated with Visna/Maedi virus in semi-intensive lamb-producing flocks in northwestern Spain. **Preventive Veterinary Medicine**, 103(2-3):163-169.

2.- LÓPEZ C., **LAGO N.**, VIÑA M., PANADERO R., DÍAZ P., DÍEZ-BAÑOS P., MORRONGO P., FERNÁNDEZ G. Lungworm infection and ovine Maedi-Visna. Real risk factor or a confounding variable? **Small Ruminant Research**. Enviado para su publicación.

B.- Comunicaciones a Congresos:

1.- FERNÁNDEZ G., **LAGO N.**, PATO F.J., LÓPEZ C., DÍEZ-BAÑOS P, CIENFUEGOS S., VIÑA M. 2008. Serological survey of maedi-visna in sheep in Lugo (North-West Spain). **Proceedings of the XVI Congress of the Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants**. Zadar, Croatia, 26 Abr 2008:377-379.

2.- FERNÁNDEZ G., **LAGO N.**, PATO F.J., VIÑA M., CIENFUEGOS S., LÓPEZ C., VÁZQUEZ L., DACAL V. 2009. Estudio de la prevalencia de la enfermedad de Maedi-Visna en las explotaciones de ovino de carne en la provincia de Lugo. **XIII Jornadas sobre producción animal**. Zaragoza, 12-13 May 2009:194-196.

3.- FERNÁNDEZ G., **LAGO N.**, LÓPEZ C., PATO F.J., CIENFUEGOS S., PANADERO R., MORRONGO P., DACAL V., VÁZQUEZ L., VIÑA M. 2009. Small ruminant lentiviruses seroprevalence in caprine flock in Galicia (Spain). **XVII International Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants (FEMESPRUM)**. Perugia, Italia, 27-30 May 2009:280.

4.- **LAGO N.**, CIENFUEGOS S., PATO F.J., PANADERO R., LÓPEZ C., VÁZQUEZ L., DACAL V., ARNES Y., FERNÁNDEZ G. 2009. Estudio de la prevalencia del Maedi Visna en las explotaciones de ovino de carne de Galicia. **34 Congreso Nacional de la Sociedad de Ovinotecnia y Caprinotecnia**. Huesca, 16-19 Sept 2009:145-149.

5.- LÓPEZ C., VIÑA M., PANADERO R., FERNÁNDEZ G., DÍAZ P., **LAGO N.**, DÍEZ-BAÑOS P., MORRONGO P. 2011. Small lungworms - a confounding variable in Maedi-Visna sheep infection. **Second International Conference of Southeastern and Eastern European Parasitological Society**. Zagreb, 14-15 Jun 2011.

Financiación:

Este trabajo se ha realizado gracias a una **Beca para la realización de estudios de tercer ciclo en las Universidades del Sistema Universitario de Galicia** (1/10/2007-30/9/2008) y a una **Beca del Programa María Barbeito** (18/01/20010-30/06/2012) concedidas por la Xunta de Galicia a Dña. Noelia Lago Rodríguez, además del soporte económico del proyecto de investigación:

Procesos respiratorios crónicos en ovinos en Galicia: estudios sobre prevalencia y dinámica de las infecciones por Maedi-Visna y por nematodos pulmonares como base para su control. (Ref. PGIDIT06RAG26101PR). Consellería de Innovación e Industria. Dirección Xeral de Investigación, Desenvolvemento e Innovación de la Xunta de Galicia. (2006-2008). Investigador principal: Ceferino López Sánchez.

AGRADECIMIENTOS:

Quiero expresar mi más sincera gratitud a todas aquellas personas que han contribuido de forma directa o indirecta a la realización del presente trabajo y de manera especial:

A mis directores, que me han brindado su apoyo, tiempo y colaboración y sin los cuales este trabajo sería difícil de concebir. Al Prof. D. Gonzalo Fernández Rodríguez, por iniciarme en este difícil, a la par que apasionante, mundo de la investigación, por sus conocimientos aportados durante estos años, por crear en mí la necesidad de buscar respuestas y por tenderme la mano ante momentos de adversidad; y al Prof. D. Pablo Díaz Fernández, por su inestimable conocimiento de las Enfermedades Parasitarias, por su capacidad de síntesis y organización, por su disponibilidad, paciencia y buen humor, que ante momentos de frustración ha sido una gran fuente de motivación.

Al Prof. D. Ceferino López Sáenz, no solo por compartir sus conocimientos informáticos y estadísticos, sino también por haber aumentado mis conocimientos en el campo de las bronconeumonías verminosas. Asimismo me gustaría agradecerle su buena disposición a la hora de resolver dudas y problemas, así como sus interesantes conversaciones durante el ratito del café.

A los Prof. Dr. Hans Houe y Prof. Dr. Nils Toft, por su gran aportación en el análisis de los datos obtenidos en este trabajo y por asegurarse de que mi estancia en Copenhague fuera productiva e inolvidable.

Al Prof. Dr. Pablo Díez-Baños y a la Profa. Dra. M^a Patrocinio Morrondo Pelayo, por su acogida y apoyo recibido desde mi comienzo en esta etapa investigadora, gracias por permitirme formar parte del equipo y por vuestra indispensable labor en la unión entre las Enfermedades Infecciosas y Parasitarias.

A todos los profesores del Área de Sanidad Animal, con especial mención a la Profa. Dra. Rosario Panadero Fontán, por concederme no solo su ayuda, sino también sus conocimientos y experiencia cuando ha sido necesario.

Al Prof. Dr. Pedro García Herradón, gracias por el apoyo brindado en momentos complicados permitiéndome continuar en mi labor investigadora.

Especial mención a los compañeros veterinarios de ACIVO, Miguel, Yolanda y Ana, por su desinteresada colaboración y asistencia profesional, gracias por vuestra ayuda, por vuestra disposición, por vuestra paciencia. Gracias por esas charlas sobre la vida durante los trayectos en coche, por las palabras de ánimo, por los buenos momentos compartidos durante la dura etapa de muestreo.

A mi gran amiga y compañera, Sara Cienfuegos. Juntas comenzamos esta andadura con duros días de muestreo, cenas improvisadas en el seminario del departamento, tardes interminables rotulando tubos Eppendorf, pasando “crotales” al ordenador...tu recuento de bolis, marcadores, campanas! Muchos momentos de trabajo compartidos, pero también muchas anécdotas y recuerdos que serán difíciles de olvidar. Fuiste y sigues siendo un gran apoyo, sabes que te echo mucho de menos y que sin tu presencia esto se hace un poco más difícil.

A Javier Rascado, gracias por formar parte del estupendo equipo de “sheeping” y por compartir tantos momentos profesionales y personales. Añoro la etapa de Rey Don García, la “suifer” y tu coca-cola para cenar. Gracias por cruzarte en mi camino.

A Alberto, amigo y compañero de viaje en este mundo de la investigación. Durante estos últimos años hemos compartido “ratonera”, momentos de “mascarilla asfixiante” en el laboratorio y conversaciones vitales de lo que está por venir. Gracias por tu ayuda incondicional, por aguantar mis quejas, frustraciones y mis días de mal humor. Gracias por estar ahí.

A Pato, por su ayuda en los interminables días de muestreo que nos han dejado momentos para no olvidar, como la “rotómbola” y “as cabras que se comen as jalletas” de cierto ganadero con aire a Barragán. Entre cafés hemos compartido inquietudes y preocupaciones, pero también risas y anécdotas que han hecho este último trecho más fácil de sobrellevar.

Quisiera agradecer a los compañeros de departamento, Silvia, Ana, José Manuel, Eva y Rosalía sus palabras de ánimo y sus conversaciones durante el rato del café. Gracias por vuestra simpatía y compañerismo.

Agradecerles también a los antiguos compañeros de departamento, Vicente y Luis, su valiosa ayuda en días de muestreo. Gracias por hacer que esos días fuesen un poco menos largos.

A mis amigas y compañeras de facultad, Laura, Iria y Camino. Gracias por las inolvidables experiencias vividas, por esos años que sin dudarlo me han marcado para el resto de mi vida. Con vosotras la palabra amistad empezó más que nunca a cobrar sentido. Éramos unas “pipiolas” recién llegadas a la facultad, con mucho por aprender, con mucho por descubrir. Clases, prácticas, fiestas, exámenes, viajes en coche Lugo-Pontevedra-Vincios-Nigrán. Veterinaria&Montirón. Mil gracias, por comprender mis ausencias, por estar ahí.

A mis amigas Chus Pardal y Vane Sendín, que aunque no las veo todo lo a menudo que quisiera, siempre puedo contar con ellas. Gracias por compartir vuestra amistad.

Gracias a Iria y a An, aparecisteis cuando más me hacíais falta. Gracias por dejarme formar parte de vuestras vidas.

Finalmente, pero no menos importante, mostrar mi más sincera y profunda gratitud a mi familia. En especial a mis sobrinas, Lia y Kessia, dos soles que me aportan alegría y son fuente de sonrisas y felicidad. A mis padres, a los que quiero más que nada en este mundo, que han dado todo lo que tienen para que yo hoy esté aquí. Gracias por ser mis guías, por enseñarme a enfrentarme al mundo con una sonrisa por bandera, por inculcar en mí los valores de la amistad, la generosidad, la curiosidad, la perseverancia y tenacidad, el amor por la naturaleza y el mundo animal. Gracias por creer siempre en mí, por estar siempre a mi lado, por consolarme y darme aliento en los momentos duros, por quererme tal y como soy. Sois los pilares que sustentan mi existencia y sin vosotros nada de esto habría tenido lugar. Y Sari, mi hermana, mi amiga, una gran parte de mi ser. Gracias por llegar, gracias por venir.

ABREVIATURAS

Ac: Anticuerpos.

ACIVO: Asociación de Defensa Sanitaria de Ovino y Caprino de Galicia.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

ADSG: Asociación de Defensa Sanitaria Ganadera.

AEC: Artritis Encefalitis Caprina.

Ag: Antígeno

AIC: criterio de información de Akaike.

ARN: Acido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

APO: Adenomatosis pulmonar ovina.

BL: Border Leicester (raza ovina).

CA: Proteína de la cápside viral.

CHAID: Detector de interacción automatizada de Chi-cuadrado o árbol de clasificación.

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad.

CPA: Células presentadoras de Antígeno.

DO: Densidad óptica.

DUTPasa: Desoxiuridin trifosfatasa.

ELISA: Ensayo de inmunoabsorbancia enzimática.

ELISAc: ELISA de competición.

ELISAI: ELISA indirecto.

Env: Gen estructural de los Lentivirus (Envelope).

FC: Fijación del complemento.

FL: Finnish Landrace (raza ovina).

Gag: Gen estructural de los Lentivirus (Group Specific Antigen).

GEE: Ecuaciones de Estimación Generalizadas.

GI: Gastrointestinales.

GM-CSF: Factor estimulante de la colonia granulocito-monocito.

IA: Incidencia acumulada.

IC: Intervalo de confianza.

IDGA: Inmunodifusión en gel de agarosa.

IF: Ile de France (raza ovina).

IFN-LV: Interferón lentiviral.

Ig: inmunoglobulina.

IL: Interleuquina.

IN: Integrasa.

L1: Larvas de primer estadio.

LB: Linfocitos B.

LT: Linfocitos T.

LTR: Long Terminal Repeats.

LVPR: Lentivirus de los pequeños rumiantes.

MV: Maedi Visna.

NC: Nucleocápside.

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal.

OR: Odds Ratio.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

Pol: Gen estructural de los Lentivirus (Polymerase).

PRT: Proteasa.

PR: Prevalencia Real.

PrPSc: Proteína priónica scrapie

Rev: Gen Estructural de los Lentivirus
(Regulator of Virion Protein Expresion).

RIA: Radioinmunoensayo.

RIPA: Radioinmunoprecipitación.

RT: Transcriptasa inversa.

RT-PCR: PCR de Transcriptasa Inversa.

Se: Sensibilidad.

SNC: Sistema nervioso central.

Sp: Especificidad.

SU: Glicoproteína hidrofílica de superficie.

Tat: Gen Estructural de los Lentivirus
(Transactivator).

TM: Glicoproteína hidrofóbica
transmembrana.

VAEC: Virus de la Artritis Encefalitis
Caprina.

VIB: Virus de la Inmunodeficiencia Bovina.

VIF: Virus de la Inmunodeficiencia Felina.

Vif: Gen regulador de los Lentivirus (Viral
Infectivity Factor).

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia
Humana.

VIS: Virus de la Inmunodeficiencia de los
Simios.

VMV: Virus Maedi Visna.

WB: Western Blotting.

TABLAS

Tabla 1. Clasificación del virus del Maedi Visna (VMV) (Comité Internacional de Taxonomía Vírica, 2012).

Tabla 2. Clasificación propuesta por Shah *et al.* (2004a) para los LVPR con la incorporación del grupo E descrito por Grego *et al.* (2007).

Tabla 3. Resultados de los diferentes estudios de seroprevalencias de MV.

Tabla 4. Resultados de los diferentes estudios de seroprevalencias de MV realizados en España (Leginagoikoa, 2011).

Tabla 5. Análisis provincial del número de ovinos según tipología, 2007 (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2007).

Tabla 6. Estructura productiva por tamaño de explotación (Consellería de medio rural, 2007).

Tabla 7. Estructura de los rebaños en Galicia por tipología (Consellería de Medio Rural, 2007)

Tabla 8. Variables independientes empleadas en el estudio de los factores de riesgo asociados con el virus del MV en rebaños semiintensivos de carne en el noroeste de España.

Tabla 9. Distribución de los animales según su estatus serológico y rango de edad.

Tabla 10. Variables independientes empleadas en el estudio de los factores de riesgo asociados con el virus del MV y la infección por parásitos broncopulmonares en rebaños semiintensivos de carne en el noroeste de España

Tabla 11. Distribución de los rebaños según la seroprevalencia real obtenida.

Tabla 12. Análisis Chi Cuadrado de la seropositividad a nivel de rebaño respecto diferentes factores de riesgo evaluados.

Tabla 13. Análisis de regresión logística de rebaños seropositivos en relación a diferentes factores de exposición evaluados.

Tabla 14. Análisis Chi Cuadrado de la seropositividad individual en relación a los diferentes factores de riesgo evaluados.

Tabla 15. Análisis GEE de la seropositividad individual a VMV en relación con los diferentes factores de exposición evaluados.

Tabla 16. Análisis Chi Cuadrado de la seropositividad individual al VMV en relación a diferentes factores de exposición evaluados en la zona de montaña.

Tabla 17. Análisis Chi Cuadrado de la seropositividad individual al VMV en relación a diferentes factores de exposición evaluados en la zona costa-centro.

Tabla 18. Análisis de regresión logística de la seropositividad individual frente al VMV en relación a diferentes factores de exposición evaluados en la zona de montaña y costa-centro, respectivamente.

Tabla 19. Estimación de la incidencia del VMV según los grupos de edad considerados, a nivel general y según el área geográfica considerada

Tabla 20. Incidencia Estimada del VMV por grupos de edad al tener en cuenta la variable contacto ovino-caprino.

Tabla 21. Incidencia Estimada del VMV por grupos de edad al tener en cuenta la variable tipo de alojamiento de los corderos antes del destete.

Tabla 22. Resultados obtenidos en el test Chi-cuadrado al analizar la infección por protostrongylidos y *Dictyocaulus filaria* con la seropositividad frente al VMV.

Tabla 23. Análisis de regresión logística de la seropositividad del VMV sin incluir la variable edad.

Tabla 24. Análisis de regresión logística de la seropositividad al VMV.

Tabla 25. Odds Ratios de la infección por protostrongylidos estratificado por edad en relación a la seroprevalencia del VMV y calculado con el método de Mantel-Haenszel.

FIGURAS

Figura 1. Esquema de un virión con las diversas estructuras y proteínas que lo conforman (Coffin, 1996b).

Figura 2. Organización genómica del provirus lentiviral ovino (Pepin *et al.*, 1998)

Figura 3. Genes estructurales y reguladores y sus proteínas (Pepin *et al.*, 1998).

Figura 4. Replicación de VMV (Perdigones, 2004).

Figura 5. Tríada ecológica.

Figura 6. Periodos de la infección por el VMV.

Figura 7. Ganado ovino en la Unión Europea y mapa de distribución de ganado ovino en España, 2007 (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2007).

Figura 8. Zonas (1= Montaña, 2= Costa-centro) en las que se divide Galicia según las principales condiciones orográficas y climáticas.

Figura 9. Tabla de registro de sueros según Nº de tubo asignado

Figura 10. Esquema del procesado de las muestras de heces.

Figura 11. Esquema del procesado de las muestras sanguíneas.

Figura 12. Esquema de dispensación de sueros control y problema en la placa ELISA.

Figura 13. Diagrama jerárquico de los datos.

Figura 14. CHAID obtenido al tener en cuenta la seropositividad individual de la totalidad de los ovinos.

Figura 15. Evolución de la seropositividad de los animales en función de la edad.

Figura 16. CHAID obtenido al tener en cuenta la seropositividad individual de los ovinos de la zona de montaña.

Figura 17. CHAID obtenido al tener en cuenta la seropositividad individual de los ovinos de la zona costa-centro.

Figura 18. Evolución de la estimación de la incidencia en relación a los grupos de edad considerados, en la totalidad de los datos y según zona geográfica.

Figura 19. Evolución de la estimación de la incidencia en relación a los distintos grupos de edad considerados en relación a la variable contacto ovino-caprino

Figura 20. Evolución de la estimación de la incidencia en relación a los distintos grupos de edad considerados en relación a la variable tipo de alojamiento antes del destete.

INDICE

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1.1. HISTORIA DE LA ENFERMEDAD	3
1.2. ETIOLOGÍA	5
1.2.1. Clasificación del VMV	5
1.2.2. Estructura Viral	9
1.2.3. Organización del Genoma Vírico	10
1.2.4. Ciclo de Infección	14
2.2.4.1. Entrada en la Célula, Transcripción, Integración y Expresión	14
2.2.4.2. Síntesis, Ensamblaje y Maduración	16
1.3. EPIDEMIOLOGÍA	18
1.3.1. Distribución Geográfica	18
1.3.2. Importancia Económica	22
1.3.3. Vías de Transmisión	27
1.3.3.1. Transmisión Horizontal	27
1.3.3.2. Transmisión Lactógena	29
1.3.3.3. Importancia Epidemiológica de las dos vías de transmisión	30
1.3.3.4. Otras vías de transmisión	32
1.3.4. Factores de Riesgo de la Enfermedad	34
1.3.4.1. Factores Asociados al Hospedador	35
1.3.4.2. Factores Asociados al Agente Causal	38
1.3.4.3. Factores Asociados al Ambiente	39
1.4. PATOGENIA	41
1.4.1. Mecanismos Patogénicos	43
1.4.2. Respuesta Inmune	43
1.4.2.1. Inmunidad Humoral	44
1.4.2.2. Inmunidad Celular	45

1.5. CUADRO CLÍNICO	48
1.5.1. Forma Pulmonar (Maedi)	48
1.5.2. Forma Mamaria	50
1.5.3. Forma Nerviosa (Visna)	52
1.5.4. Forma Articular	52
1.6. DIAGNÓSTICO	53
1.6.1. Diagnóstico Clínico y Anatomopatológico	54
1.6.2. Diagnóstico Laboratorial Indirecto	55
1.6.3. Diagnóstico Laboratorial Directo	58
1.7. PREVENCIÓN Y CONTROL	61
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	69
3. MATERIAL Y MÉTODOS	75
3.1. POBLACIÓN Y ZONA DE ESTUDIO	75
3.2. EXPLOTACIONES ESTUDIADAS, TOMA DE MUESTRAS Y RECOGIDA DE DATOS	77
3.2.1. Explotaciones incluidas en el estudio	77
3.2.2. Toma de muestras y conservación	79
3.2.3. Toma de datos de animales y explotaciones	80
3.3. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EMPLEADAS	81
3.3.1. Muestras de Heces	81
3.3.2. Muestras Sanguíneas	82
3.3.2.1. Equipos, materiales y reactivos empleados en el test ELISA	83
3.3.2.2. Procedimiento del ensayo	83
3.3.2.3. Expresión e interpretación de los resultados obtenidos	86
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	86
3.4.1. Estudio 1: Prevalencia del VMV en explotaciones de ovino de carne y estudio de los factores de riesgo de la enfermedad	87

3.4.2. Estudio 2: Calculo inferido de la incidencia del MV a partir de datos transversales	90
3.4.3. Estudio 3: Estudio de la relación entre parásitos broncopulmonares y el Maedi Visna	92
4. RESULTADOS	97
4.1. ESTUDIO 1: PREVALENCIA DEL VMV EN EXPLOTACIONES DE OVINO DE CARNE Y ESTUDIO DE LOS FACTORES DE RIESGO DE LA ENFERMEDAD	97
4.1.1. Factores de Riesgo relacionados con la seropositividad a nivel de rebaño	97
4.1.2. Factores de Riesgo relacionados con la seropositividad a nivel individual	99
4.1.2.1. Relación entre la seropositividad individual al VMV y los factores de riesgo en las diferentes zonas geográficas	104
4.2. ESTUDIO 2: CALCULO INFERIDO DE LA INCIDENCIA DEL MV A PARTIR DE DATOS TRANSVERSALES	110
4.3. ESTUDIO 3: ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE PARÁSITOS BRONCOPULMONARES Y EL MAEDI VISNA	113
4.3.1. Efecto individual de las parasitaciones broncopulmonares en la población ovina estudiada	113
4.3.2. Análisis de regresión logística y procedimiento de Mantel-Haentszel	114
5. DISCUSIÓN	119
6. CONCLUSIONES	135
7. RESUMEN-SUMMARY	141
8. BIBLIOGRAFÍA	155

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. HISTORIA DE LA ENFERMEDAD

La enfermedad conocida hoy en día como Maedi Visna (MV), fue la primera integrante de una categoría de procesos englobados bajo el epígrafe de “infecciones lentas” y cuya característica principal es su largo periodo de incubación. No solo en este hecho reside su importancia histórica, sino que además se trata de la primera enfermedad cuyo agente causal fue identificado como un Lentivirus, descrito por el científico islandés Sigurdsson en 1954. La primera referencia a esta infección podría datar del año 1862, cuando se describe una enfermedad con cuadro respiratorio crónico en ganado ovino de la isla holandesa de Texel (Loman, 1862). Sin embargo, para muchos autores, no es hasta el siglo XX cuando se describen varias enfermedades con cuadros clínicos que coinciden plenamente con lo que hoy conocemos como MV. En cada país la enfermedad recibió diferentes denominaciones: en Sudáfrica se la conocía como enfermedad de Graaff-Reinet (De Kock, 1929), en Norteamérica como enfermedad de Montana (Marsh, 1923), en Francia como Bouhite o “lymphomatose pulmonaire maligne du mouton” (Lucam, 1942), en Holanda como Zwoegerziekte (Koens, 1943) y en Islandia como Maedi-Visna (Sigurdsson *et al.*, 1952; Sigurdsson, 1954). Es en 1968, cuando Ressang *et al.* sugieren que todas estas enfermedades no eran más que un mismo proceso con distintas denominaciones, proponiendo el nombre islandés Maedi-Visna. Cabe destacar que en EE.UU. la enfermedad se sigue conociendo en la actualidad como Neumonía Progresiva Ovina, aunque también se reconoce el término MV (De la Concha-Bermejillo, 1997).

El MV es además conocido por protagonizar uno de los ejemplos con consecuencias más desastrosas de transmisión y epidemia de un virus en una población animal como resultado de la importación de ejemplares vivos infectados (Pálsson, 1976). En la década de 1930, con objeto de mejorar la raza ovina autóctona de Islandia, se importaron 20 machos de raza Karakul provenientes de la ciudad alemana de Hale (Sigurdsson, 1954; Pepin *et al.*, 1998; Straub, 2004). En el momento de la importación los animales no presentaban sintomatología respiratoria alguna, por lo que tras un periodo de cuarentena en una isla cercana, se incorporaron en diversos rebaños islandeses. Este hecho, junto al sistema de cría de ovino de Islandia, que facilitaba el contacto de distintos rebaños durante la época de pastoreo y confinaba a

los animales durante el largo periodo invernal, favoreció la rápida propagación de la infección por todo el país. Algunos de los animales introducidos eran portadores no solo del virus del Maedi-Visna (VMV), sino también de otras dos enfermedades: la Paratuberculosis y la Adenomatosis Pulmonar Ovina (APO) (Sigurdsson, 1954; Pálsson, 1962). Aunque nunca se ha llegado a erradicar totalmente de la población ovina islandesa, la paratuberculosis se detectó de forma temprana tomándose las medidas oportunas para evitar una mayor propagación: se llevó a cabo una vacunación masiva de la reposición, controlando rápidamente las posibles pérdidas económicas que podría haber generado (Fridriksdottir *et al.*, 2000). La APO, sin embargo, no se descubrió hasta el año siguiente, cuando el número de bajas era ya muy elevado, estableciéndose en 1937 un plan de lucha y erradicación de la enfermedad (Luján *et al.*, 2001b). En este momento, con la APO bajo control, se empiezan a reconocer en los rebaños nuevos signos que anteriormente habían pasado inadvertidos: por un lado animales que presentaban un síndrome respiratorio, al que comenzaron a llamar Maedi (palabra que en islandés significa disnea, fatiga) y, por otro, animales con un cuadro nervioso que denominaron Visna (en islandés, desgaste o enflaquecimiento) (Sigurdsson *et al.*, 1952; Sigurdsson, 1954). El Maedi fue el primero en ser detectado, en el año 1939, mientras que el Visna lo fue a inicios de los años cuarenta. El solapamiento de la enfermedad con la APO, así como el característico largo periodo de incubación y comienzo insidioso del MV, favorecieron que la enfermedad se detectase tardíamente, cuando ya se encontraba ampliamente distribuida en la población ovina. La mortalidad fue muy elevada y en 1940 se decidió ampliar la campaña de la APO con la del MV, llegándose a sacrificar rebaños enteros cuando aparecían animales afectados y reemplazándose por ganado ovino procedente de zonas donde la enfermedad estaba ausente. Es a principios de los años cincuenta, más de una década después de que el VMV se introdujese en Islandia, cuando Sigurdsson consigue aislar y describir por primera vez el agente causal de la enfermedad (Sigurdsson *et al.*, 1952), mientras que finalmente en 1974 se llega a la conclusión de que tanto el “Maedi” como el “Visna” eran dos síndromes producidos por un mismo virus (Gudnadottir, 1974).

1.2. ETIOLOGÍA

1.2.1. Clasificación del VMV

El agente causal del MV es un virus no oncogénico, perteneciente a la familia Retroviridae, género Lentivirus y englobado dentro del subgénero Lentivirus de los Pequeños Rumiantes (LVPR), junto con el virus de la artritis encefalitis caprina (VAEC) (Álvarez *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2006). Los retrovirus son una familia de virus que se caracterizan por presentar la información genética codificada en secuencias de ácido ribonucleico (ARN) (Fan, 2009), siendo necesaria la enzima denominada transcriptasa inversa (RT), que media en la transformación del ARN genómico en ADN complementario (ADNc), paso previo indispensable en la replicación del virus (Fan, 2009).

La familia Retroviridae se divide en dos subfamilias y siete géneros (Tabla 1), entre los cuales encontramos agentes etiológicos de gran interés en medicina humana y veterinaria. Dentro del género Lentivirus, destacan el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) (Pedersen *et al.*, 1989), la inmunodeficiencia bovina (VIB) (Gonda *et al.*, 1994), la inmunodeficiencia de los simios (VIS) (Ringler *et al.*, 1988) y uno de los más mediáticos, el virus de la inmunodeficiencia adquirida humana (VIH) (Levy, 1993). El VMV y el VIH comparten características comunes, no solo el representativo período de incubación prolongado, sino también su naturaleza progresiva, crónica y con desenlace fatal. Este hecho ha ocasionado que los estudios sobre el MV hayan aumentado en los últimos años. No obstante, presentan importantes diferencias entre ambos, siendo una de las más importantes el tipo de células diana empleadas por ambos virus. El VMV utiliza exclusivamente monocitos y macrófagos como células diana (Pepin *et al.*, 1998), mientras que el VIH emplea también los linfocitos T (LT) CD4 +, llegando a provocar inmunodeficiencia (Levy, 1993). Esta diferencia entre ambos hace que el VMV se emplee como modelo en el estudio de los efectos de infecciones por lentivirus en la biología de los macrófagos y también para conocer el papel que juegan estas células en la patogenia de la enfermedad en ausencia de inmunodeficiencia. Por otro lado, se ha demostrado que el VMV puede ser un modelo *in vitro* para probar nuevos medicamentos frente al VIH (Salvatori *et al.*, 2001).

ESPECIES DE INTERÉS EN VETERINARIA			
Familia Retroviridae	<u>Orthoretrovirinae</u>	Alpharetrovirus	Virus de la Leucosis Aviar
		Betaretrovirus	Adenomatosis Pulmonar Ovina
		Deltaretrovirus	Virus de la Leucemia Bovina
		Gammaretrovirus	Virus de la Leucemia Felina
		Epsilonretrovirus	Virus del sarcoma dérmico Walleye
	Spumaretrovirinae	<u>Lentivirus</u>	<u>Virus del Maedi Visna</u>
			Virus de la Artritis Encefalitis Caprina
			Virus de la Inmunodeficiencia Humana
			Virus de la Inmunodeficiencia de los Simios
			Virus de la Anemia Infecciosa Equina
			Virus de la Inmunodeficiencia Bovina
			Virus de la Inmunodeficiencia Felina
		Spumavirus	Virus Espumoso de los Simios

Tabla 1. Clasificación del virus del Maedi Visna (VMV) (Comité Internacional de Taxonomía Vírica, 2012).

Los lentivirus son, dentro de los siete géneros que componen la familia Retroviridae, los que presentan una mayor complejidad en su estructura genómica. A parte de los tres genes estructurales comunes para todos los retrovirus (*gag*, *pol* y *env*), los lentivirus poseen varios genes auxiliares cuya información codifica para proteínas reguladoras (Clements y Zink, 1996).

Otra singularidad destacada de este género es su elevada heterogeneidad genética (Zanoni *et al.*, 1992). Los lentivirus se caracterizan por ser genéticamente inestables, presentando un alto porcentaje de evolución del genoma debido a los frecuentes errores cometidos por la RT durante la replicación (Pisoni *et al.*, 2007a). Este hecho es común en los virus ARN, que están sujetos a recombinaciones genéticas con virus idénticos o de especies relacionadas. Gracias al avance en el desarrollo de técnicas biomoleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la secuenciación génica, se han podido establecer relaciones filogenéticas entre los distintos lentivirus (Rosati *et al.*, 1995; Sargan *et al.*, 1995; Woodward *et al.*, 1995). Hoy en día existen evidencias de que este proceso de recombinación podría ocurrir *in*

vivo, como ocurre en el caso del MV y de la AEC (Shah *et al.*, 2004b). Estas dos enfermedades se consideraron durante mucho tiempo como específicas de ovinos y caprinos, respectivamente. Sin embargo, en la actualidad, varios estudios sugieren que el salto interespecie es posible (Brülisauer *et al.*, 2005; Gjerset *et al.*, 2007), indicándose incluso que la erradicación de la enfermedad en una especie no descarta la presencia de infección en la otra (Peterhans *et al.*, 2004). En un estudio realizado por Shah *et al.* (2004b), se encontró una evidencia directa de la transmisión natural de LVPR del subtipo A4 de cabras a ovejas y viceversa.

El progreso realizado en el ámbito de la biología molecular durante los últimos años ha permitido la secuenciación nucleotídica de los genomas del VMV y del VAEC. Los resultados obtenidos demuestran que ambos virus presentan una organización genómica similar en lo que se refiere tanto a sus genes estructurales como a los reguladores (Narayan *et al.*, 1993). Al comparar las secuencias nucleotídicas de VMV y VAEC se comprobó que la homología para los genes ***gag*** y ***pol*** entre ambos virus es muy alta, de un 75% y 78% respectivamente (Zanoni, 1998). Por el contrario, la homología es menor en lo que respecta al gen ***env*** (60%), aún cuando el patrón de dominios hidrofílicos e hidrofóbicos de las proteínas de la envuelta parecen estar muy conservados (Braun *et al.*, 1987). Varios autores señalan que algunas secuencias de lentivirus de origen ovino están incluso más relacionadas con el VAEC que con VMV y viceversa (Narayan *et al.*, 1993; Reina *et al.*, 2006).

A la luz de estos resultados y debido a la gran heterogeneidad detectada en los LVPR, se hace imprescindible una nueva clasificación filogenética de este subgénero (Shah *et al.*, 2004a; Pisoni *et al.*, 2005). Uno de los primeros intentos fue el realizado por Zanoni (1998), que dividió los LVPR en seis subtipos diferentes (I-VI). Sin embargo, tras realizar el estudio filogenético de 104 aislamientos víricos a partir de muestras tanto ovinas como caprinas, Shah *et al.* (2004a) observaron que varias cepas de LVPR no se ajustaban a dicha clasificación, por lo que propusieron otra basada en las características antigénicas de los LVPR, tomando como referencia la secuencia de aminoácidos de los epítomos inmuno-dominantes de la cápside viral. La nueva clasificación divide a los LVPR en dos grupos principales, A y B, donde se encuentran la mayoría de las cepas víricas aisladas (Tabla 2). Dos cepas, aisladas en cabras de Noruega y en una cabra en Suiza y que presentaban una alta divergencia con los otros

grupos, se han clasificado provisionalmente como grupos C y D. El grupo A se subdivide en 7 subtipos, nombrados de modo consecutivo de A1 a A7 (Tabla 2), agregándose recientemente los subtipos A8, A9 y A10 (Grego *et al.*, 2007; Laamanen *et al.*, 2007). El grupo B sin embargo, solo incluye los subtipos B1 y B2. Dentro del grupo A1 encontramos los virus originalmente aislados en ovino (prototipos VMV) mientras que los virus aislados originalmente en cabras (prototipos VAEC) se clasifican dentro del grupo B1.

Nuevos grupos propuestos	Nuevos Subtipos	Antigua Clasificación (Zanoni, 1998)	Características
A	A1	I	Prototipo VMV; puede que sea necesaria su división en más de un subtipo
	A2	II	Ovejas de Norte América (Karr <i>et al.</i> , 1996)
	A3	-	Aislados de cabras y ovejas de Suiza
	A4	-	Aislados de cabras y ovejas de Suiza
	A5	-	Aislamiento vírico único procedente de una cabra de Suiza.
	A6	VI	Aislados procedentes de ovejas y cabras del sur de Francia
	A7	-	Aislamiento vírico único procedente de una cabra de Suiza
B	B1	V	Prototipo AEC, aislados de cabras de diferentes países
	B2	IV	Aislados de cabras y ovejas en el sur de Francia y de dos ovejas de Suiza
C	-	III	Aislados de cabras en Noruega
D	-	-	Aislamiento vírico único procedente de una cabra de Suiza.
E	E1		Grego <i>et al.</i> , 2007
	E2		Reina <i>et al.</i> , 2010

Tabla 2. Clasificación propuesta por Shah *et al.* (2004a) para los LVPR con la incorporación del grupo E descrito por Grego *et al.* (2007).

Cabe destacar que en un trabajo posterior, realizado por Grego *et al.* (2007), se describe un nuevo prototipo clasificado como grupo E, detectado únicamente en cabras de la raza local italiana Roccaverano y descrito como un LVPR de baja patogenicidad. Recientemente, este grupo se ha detectado en otra raza caprina italiana, la Sarda (exclusiva de Cerdeña), aunque al presentar ciertas divergencias con el primer prototipo descrito se propuso la división del grupo E en dos subtipos, E1 y E2

(Reina *et al.*, 2010). En este trabajo se sugiere que el grupo E es exclusivo de caprinos, ya que los aislados ovinos analizados hasta el momento no han presentado dicho genotipo.

1.2.2. Estructura Viral

Los viriones de los lentivirus, que son las partículas víricas maduras, tienen forma esférica y miden entre 90 y 120 nm de diámetro. Constan de una estructura única en tres capas que aloja en su interior dos moléculas idénticas de ARN monocatenario de unos 9.000-10.000 pares de bases, con el extremo 5' metilado y el 3' poliadenilado (Coffin, 1996b). El ARN se encuentra estrechamente relacionado con tres enzimas:

- *Transcriptasa inversa* (RT), codificada por el gen *pol*, permite la transcripción del ARN viral en ADN.
- *Integrasa* (IN), cuya función es facilitar la unión covalente del ADNc vírico al genoma de la célula hospedadora
- *Proteasa* (PRt), la cual provoca la lisis de los productos poliproteicos codificados por los genes estructurales

Este complejo genoma-nucleoproteína localizado en la región central del virus, se rodea de una cápside troncocónica la cual, a su vez, está recubierta por una envoltura con proyecciones glicoproteicas derivada de la membrana plasmática de la célula hospedadora, adquirida durante la salida del virus de la misma mediante el proceso de gemación (Figura 1).

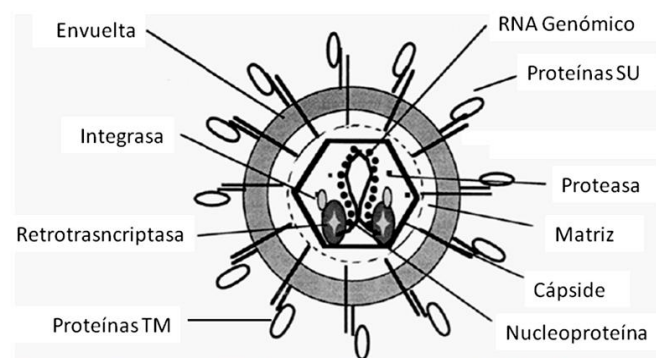


Figura 1. Esquema de un virión con las diversas estructuras y proteínas que lo conforman (Coffin, 1996b).

En cuanto a las características físico-químicas, los lentivirus tienen una densidad en gradiente de sacarosa de 1,5-1,6 g/ml y un punto isoeléctrico de 6,8. Están compuestos en su mayor parte por proteínas (60%) y lípidos (35%), y en menor porcentaje por carbohidratos (3%) y ARN (2%), lo que determina su elevada resistencia a las condiciones ambientales adversas (Juste y De la Concha-Bermejillo, 2001), permaneciendo activos hasta 4-5 meses a 4 °C y manteniendo su infectividad a -80 °C durante años, siendo capaces de soportar varios ciclos de congelación y descongelación. A 56 °C se inactivan en 10 minutos y son relativamente poco resistentes a los agentes químicos: se destruyen fácilmente con éter, cloroformo, periodato, etanol, formaldehído, fenol, tripsina y ribonucleasa, pero soportan bien la sonicación. Al no contener ADN están protegidos frente a la radiación ultravioleta y frente a la desoxirribonucleasa. El virus se inactiva a pH inferior a 4,2 y tolera mejor los pHs alcalinos, manteniendo su infectividad a pHs entre 5,1 y 10 (Thormar, 1961; Thormar, 1965).

1.2.3. Organización del Genoma Vírico

La organización genómica del VMV es la típica de los lentivirus, con la información genética codificada en un dímero de ARN monocatenario que consta de tres genes estructurales, que del extremo 5' al 3' son: ***gag*** (group-specific-antigen), ***pol*** (polymerase) y ***env*** (envelope), y de tres genes auxiliares o reguladores (***vif***, ***tat*** y ***rev***). A su vez, el ADN proviral se encuentra flanqueado por dos fragmentos denominados **Long Terminal Repeats** (LTR), necesarios para la transcripción, integración y poliadenilación del ARN viral (Figura 2, 3) (Pepin *et al.*, 1998).

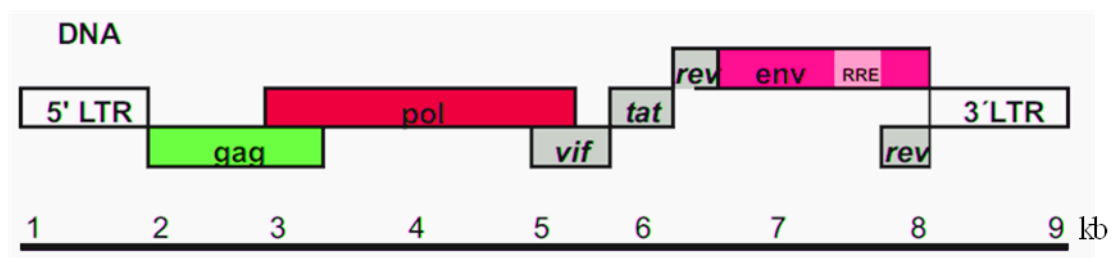


Figura 2. Organización genómica del provirus lentiviral ovino (Pepin *et al.*, 1998).

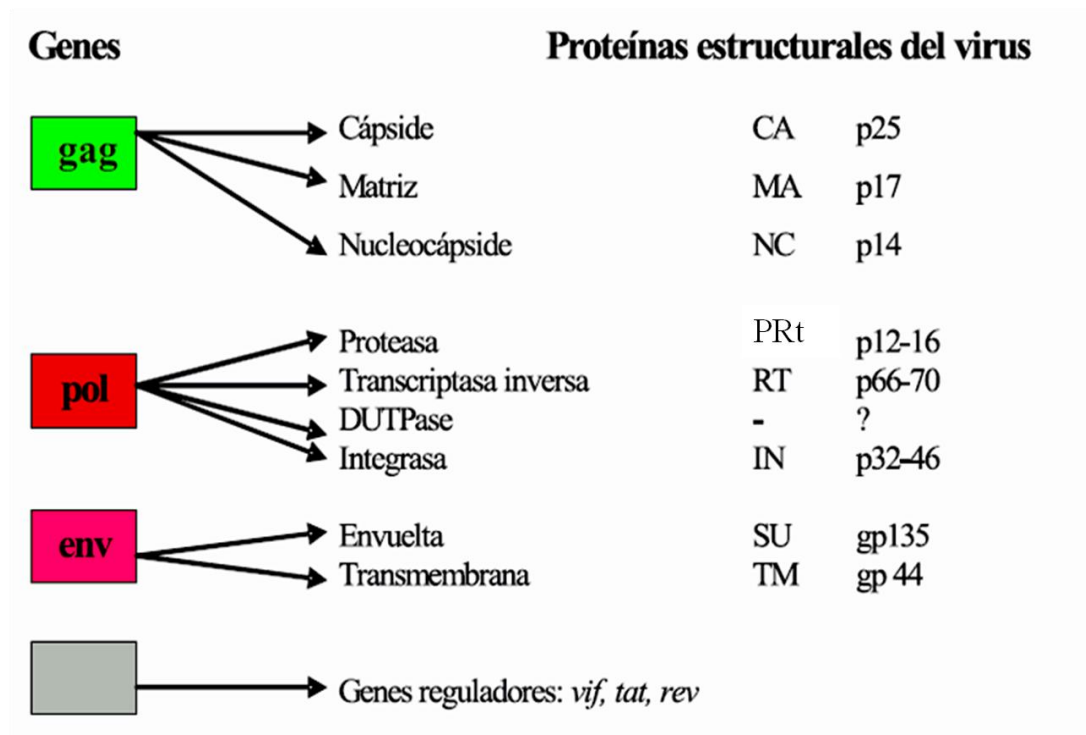


Figura 3. Genes estructurales y reguladores y sus proteínas (Pepin *et al.*, 1998).

Genes Estructurales

El gen ***gag*** (group-specific-antigen) es un gen altamente conservado y codifica para tres glicoproteínas procedentes del precursor Pr55gag (Álvarez, 2005):

- **CA** (p25): es la proteína presente en la cápside vírica, y la mayoritaria en el virión. Constituye la zona hidrofóbica del núcleo y provoca una potente respuesta inmune en el hospedador por lo que se emplea como base en el desarrollo de pruebas diagnósticas.
- **NC** (p14): también denominada proteína de la nucleocápside. Envuelve el ARN vírico junto con los enzimas necesarios para la transcripción e integración del virus, transcriptasa inversa e integrasa, respectivamente.
- **MA** (p17): o proteína de la matriz, asegura la unión entre la cápside y la envoltura.

El gen ***pol*** (Polymerase) contiene la información necesaria para la síntesis de enzimas imprescindibles en la replicación viral y la síntesis proteica:

- **Transcriptasa inversa (RT):** permite la transcripción del ARN vírico en ADN.
- **Proteasa (PRt):** rompe los precursores de las poliproteínas codificadas por el gen *gag*.
- **Endonucleasa / integrasa (IN):** permite la inserción del ADN vírico, obtenido tras la transcripción inversa, en el ADN de la célula hospedadora (Katzman y Sudol, 1994)
- **dUTPasa** (Desoxiuridin trifosfatasa): la actividad de esta enzima se ha detectado en lentivirus de ovejas, cabras, gatos y caballos, aunque está ausente en lentivirus de primates (Elder *et al.*, 1992). La dUTPasa parece reducir la frecuencia de mutaciones de guanina (G) a adenina (A). Se ha observado *in vitro* que el VAEC sin dUTPasa se replica más despacio en los macrófagos (Turelli *et al.*, 1996), encontrándose ligeramente atenuados en condiciones de campo (Turelli *et al.*, 1997). Por el contrario, en el caso del VMV, el carecer de esta enzima dUTPasa, parece no afectar a la patogenicidad del virus, tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro* (Pétursson *et al.*, 1998).

El gen **env** (Envelope) codifica para las glicoproteínas de la envuelta del virus. Las glicoproteínas virales son sintetizadas en forma de un precursor, la glicoproteína **gp160**. En el interior de la célula hospedadora ésta se escinde en dos subunidades mediante una proteasa, dando lugar a:

- **gp135 (SU)** o glicoproteína hidrofílica de superficie. Tiene forma de pomo y sobresale marcadamente de la partícula vírica. Es la responsable de la entrada del virus en la célula hospedadora al interaccionar con el receptor de la misma. La respuesta inmune del hospedador estimula la variación antigénica de la proteína (Carey y Daziel, 1993), responsable de conferir las propiedades biológicas y serológicas de los distintos virus aislados.

- **gp44 (TM)** o glicoproteína hidrofóbica transmembrana. Se encuentra en la doble capa lipídica de la envuelta anclando la gp135 (SU) a la envoltura. Esta glicoproteína se encuentra más conservada que la SU.

Genes Auxiliares

El gen **tat** (Transactivator) codifica para una proteína de 14-15 kDa que tiene como función la transactivación del provirus generando un aumento en los niveles de expresión del virus en el momento de la maduración de monocitos a macrófagos (Davis y Clements, 1989).

El gen **vif** (Viral Infectivity Factor) codifica una proteína reguladora de 29 kDa, gracias a la cual las partículas víricas adquieren su poder infectante. En estudios realizados empleando el VAEC y el VIH como modelos, se ha visto que el gen *vif* juega un papel importante en las últimas fases del ciclo viral. Estudios recientes demuestran que el gen *vif* es esencial para la capacidad infectiva del virus tanto *in vivo* como *in vitro* (Kristbjörnsdóttir *et al.*, 2004).

El gen **rev** (Regulator of Virion protein expression) produce una proteína de 19 kDa capaz de atravesar la membrana celular y ejercer así su acción reguladora de la expresión vírica (Pepin *et al.*, 1998).

Long Terminal Repeats (LTR)

Estas regiones se forman en el transcurso de la replicación del virus en la célula hospedadora, durante el proceso de transcripción del ARN en ADN, generándose a ambos extremos del ácido nucleico. Los LTR están compuestos por secuencias repetidas e incluyen las regiones que en dirección 5'- 3' son: U3, R y U5. Dentro de la región U3 aparecen secuencias diana que influyen en los niveles de transcripción del genoma, observándose variabilidad en secuencias de distintas cepas de LVPR (Sargan *et al.*, 1995; Pepin *et al.*, 1998; Barros *et al.*, 2004) y se ha relacionado una delección en la región R con cepas de baja patogenicidad (Angelopoulou *et al.*, 2007). Los LTR juegan un papel importante en la transcripción vírica, pero también en el tropismo celular (Agnarsdóttir *et al.*, 2000) y en la cinética de replicación *in vitro*, relacionándose

con el fenotipo lento/bajo en células pulmonares y de plexo coroideo (Barros *et al.*, 2005).

1.2.4. Ciclo de Infección

1.2.4.1. Entrada en la Célula, Transcripción, Integración y Expresión

La replicación del VMV tiene lugar tanto en los monocitos circulantes como en los macrófagos (Dawson, 1987). Cuando la partícula vírica entra en contacto con una célula susceptible, se produce el anclaje de la glicoproteína SU con los receptores celulares de la célula huésped, produciéndose la fusión entre la membrana celular y la envoltura vírica (Juste y De la Concha-Bermejillo, 2001). Se desconoce cuáles son los receptores celulares, aunque se considera que podrían ser de tipo proteoglicano (Bruett *et al.*, 2000). Tras esta fase de adsorción y penetración, la nucleocápside queda liberada en el citoplasma, y es entonces cuando comienza el proceso de retrotranscripción (Juste y De la Concha-Bermejillo, 2001).

La RT transcribe el ARN vírico en una doble cadena de ADN (Clements y Zink, 1996). Durante este proceso, las regiones R, U5 y U3 del genoma del virión se duplican generándose las dos copias de la región LTR que se sitúan a ambos flancos del ADN vírico. A continuación la nueva copia de ADN se introduce en el núcleo celular gracias a las nucleoproteínas de la cápside (Coffin, 1996b).

Una vez en el núcleo, la endonucleasa/integrasa inserta el ADN vírico en la célula hospedadora, de tal forma que el animal permanecerá infectado de por vida. Una vez el genoma vírico está insertado en el genoma de la célula hospedadora recibe el nombre de provirus. La zona donde se localiza el punto de integración es aleatoria, aunque las secuencias adyacentes al provirus son siempre similares. Cada célula integra solamente una única copia del genoma vírico puesto que existen fenómenos de interferencia que impiden que una célula ya infectada vuelva a infectarse (Coffin, 1996b). Para que ocurra la infección productiva de las células, tanto *in vivo* como *in vitro*, es necesario que ocurra este proceso de integración (List y Haase, 1997).

Una vez integrado en el ADN nuclear, el provirus se mantiene completamente estable, comportándose inicialmente como cualquier otra región del cromosoma: no interfiere en la actividad de la misma y sólo se expresa cuando la célula se divide (Coffin, 1996b). La producción vírica es bastante baja en un primer momento y depende de la maquinaria de transcripción celular. En periodos más tardíos, las llamadas proteínas transactivadoras, codificadas por el gen *tat*, incrementarán los niveles de expresión del virus (Coffin, 1996b). Los mecanismos moleculares que regulan la expresión del virus dependen a su vez de factores ambientales. Así, uno de estos factores ambientales reconocidos es el grado de maduración de las células. En el caso del VMV la transcripción del provirus solo tiene lugar cuando el monocito (célula diana) madura a macrófago (Gendelman *et al.*, 1986). Existen estudios que indican que en los monocitos hay un bloqueo en la transcripción del ARN. Mediante hibridación *in situ* se ha comprobado la ausencia de ARN viral en monocitos y la presencia del mismo en macrófagos (Gendelman *et al.*, 1986). Esto podría indicar que los monocitos actuarían como meros transportadores del virus en sangre circulante. Otras células con esta función podrían ser las células dendríticas, aunque es un hecho difícil de comprobar debido a la complejidad de separar ambas poblaciones celulares (Gorrell *et al.*, 1992). Se ha observado *in vivo* proteínas de VMV en fibroblastos y células epiteliales del plexo coroidal, pericitos, linfocitos y células plasmáticas del sistema nervioso central, aunque la infección productiva se restringe exclusivamente a las células de la estirpe monocito/macrófago (Gorrell *et al.*, 1992; Brodie *et al.*, 1995). Las células epiteliales del epitelio mamario son capaces de emitir partículas víricas completas a la luz alveolar mediante gemación (Bolea, 1998). Cabe destacar que la replicación viral *in vitro* no sufre este bloqueo específico de tipo de célula hospedadora, produciéndose el efecto citopático en una gran variedad de cultivos celulares tras las primeras 24-36 horas, con aparición de células gigantes multinucleadas y lisis celular (Sigurdsson *et al.*, 1960; Sihvonen y Veijalainen, 1981).

Como se ha mencionado con anterioridad, hasta la fecha se desconoce la identidad del receptor o receptores que utiliza el VMV para su penetración en la célula hospedadora, habiéndose propuesto varias posibilidades a lo largo de la historia. En 1991, Dalziel *et al.*, concluyeron que las moléculas de clase II del complejo mayor de

histocompatibilidad (CMH) forman parte de dicho receptor, ya que al incubarse con el VMV se inhibía la infección viral, aún cuando *in vivo* la infección no se inhibe con anticuerpos (ACs) de clase II específicos. Ese mismo año, Crane *et al.* (1991), realizaron un ensayo empleando cultivos víricos purificados y células del plexo coroideo ovino y de la membrana sinovial caprina. En dicho estudio se determinaron los pesos moleculares de las moléculas de superficie celulares a las que se unían los virus purificados, obteniendo una proteína con masa molecular de 50 kDa como posible receptor celular. Dicha proteína se expresaba en las células susceptibles al virus y observaron que al añadir ACs policlonales, éstos se unían a estas proteínas de 50 kDa, produciéndose una reducción significativa en la unión del virus a las células. Bruett *et al.* (2000), ampliaron el estudio llevado a cabo por Crane, demostrando que era una proteína de membrana asociada a un proteoglicano. Por otra parte, Lyall *et al.* (2000), detectaron que el receptor estaba presente no solo en líneas celulares ovinas, sino también en líneas celulares de humanos, monos, ratones, hámsteres, pollos y codornices, y afirmaron que dicho receptor es sensible a la proteólisis por la enzima papaína pero no por la tripsina, por lo que debe tratarse de un componente proteico de la superficie celular. En un estudio realizado en Noruega (Hovden, 2001), se llegó a la conclusión que tanto las moléculas CD4 como los co-receptores para las quimioquinas CXCR4, los cuales juegan un papel importante como receptores del VIH, actúan como moléculas auxiliares o correceptoras que facilitan la entrada del virus en la célula, si bien no se trata de los receptores principales del VMV. Uno de los últimos trabajos en el cual se aborda esta incógnita es el realizado por Crespo *et al.* (2011), concluyendo que, *in vitro*, existen al menos tres patrones distintos de entrada del virus en la célula (según la célula diana) y en todos ellos los receptores de manosa estarían de algún modo implicados en el proceso.

1.2.4.2. Síntesis, Ensamblaje y Maduración

La síntesis de las proteínas víricas tiene lugar en dos emplazamientos distintos del citoplasma y a partir de dos unidades distintas del ARNm. Las proteínas de la cápside y las enzimas víricas se sintetizan en los polirribosomas libres del citoplasma celular, mientras que las proteínas de la envuelta se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso (Coffin, 1996b).

El ensamblaje de la partícula vírica se lleva a cabo en el citoplasma, uniéndose el precursor con el ARN genómico y con otras proteínas. Tras el ensamblaje, la partícula vírica se dirige hacia la membrana celular donde, por un proceso de gemación, sale al medio extracelular cubierto por la membrana plasmática de la célula (envuelta del virus), y sobre la cual sobresalen las glicoproteínas SU antigénicas (Figura 4) (Coffin, 1996b).

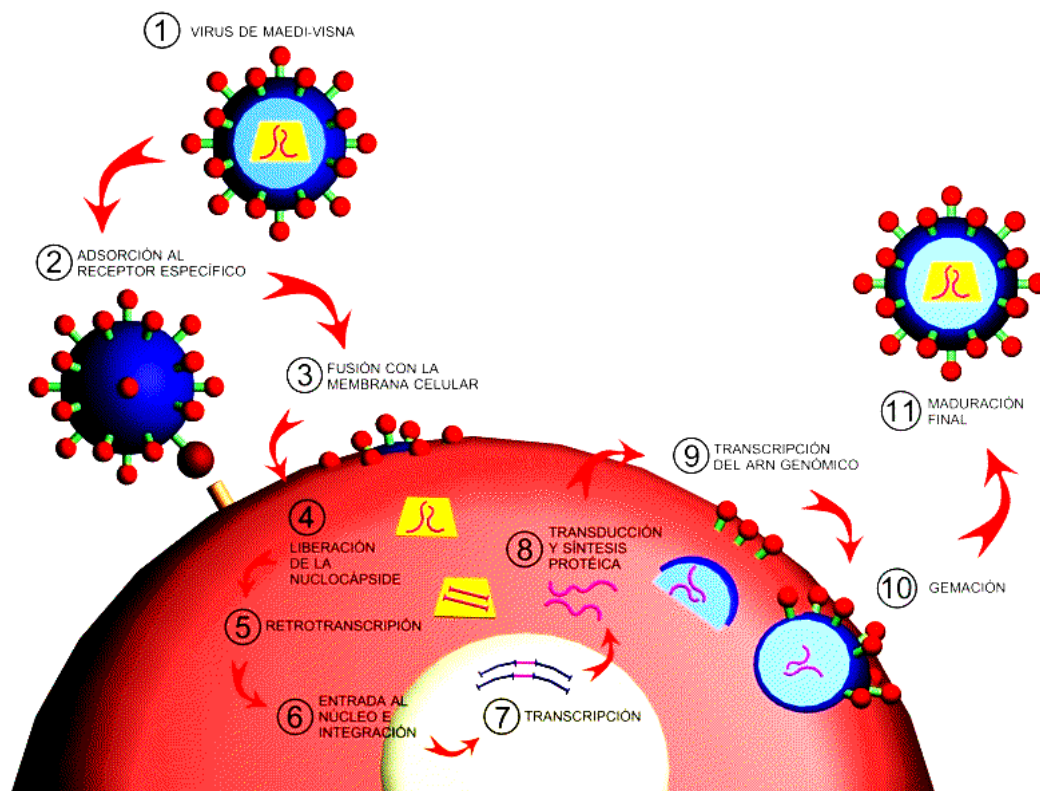


Figura 4. Replicación del VMV (Perdigones, 2004).

Sólo tras liberarse el virión y por acción de la PRt, se produce la maduración final de los precursores proteicos, lo que confiere capacidad infectante a la partícula vírica. Se cree que el patrón básico de la transcripción inversa y la expresión de genes ocurren de manera similar tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, parece que existe un bloqueo de la replicación viral *in vivo*, ya que el virus no puede recuperarse de homogeneizados de tejidos de animales infectados, mientras que si se realiza un explante o si estos tejidos se cultivan en un tipo celular permisivo, el virus infectante puede ser detectado (Carey y Daziel, 1993).

La expresión génica del VMV aumenta durante el desarrollo de los monocitos a macrófagos. Los monocitos que circulan vía sanguínea contienen el genoma vírico inactivo, lo cual se ha denominado como mecanismo de “caballo de Troya” (Peluso *et al.*, 1985). De este modo los virus se transportan hasta los tejidos sin ser detectados por el sistema inmune. Una vez alcanzado este nivel, los monocitos maduran a macrófagos. Es en este momento cuando el VMV comienza la replicación, aprovechándose de los mecanismos celulares que actúan en la diferenciación celular para emplearlos en su propio beneficio.

Se han descrito distintas clases de cepas víricas de lentivirus ovinos según su patogenicidad tanto *in vivo* como *in vitro* (De la Concha-Bermejillo, 1997). Por un lado, las denominadas cepas rápidas o altamente patogénicas, se caracterizan por inducir rápidamente formación de sincitios, presentar un título muy alto de replicación, ser citolíticas y producir, por lo general, signos muy drásticos de enfermedad. Por otro, las denominadas cepas lentas o de baja patogenicidad, inducen sincitios de forma lenta pero progresiva, presentan bajos títulos de replicación y no suelen producir ninguna evidencia de signo clínico.

1.3. EPIDEMIOLOGÍA

1.3.1. Distribución Geográfica

El MV se encuentra ampliamente distribuido y ha sido reconocido en gran parte de los países con mayor producción ovina, con la excepción de Australia y Nueva Zelanda, donde nunca se ha descrito la enfermedad; sin embargo en Australia sí se han descrito infecciones por LVPR en cabras (Greenwood *et al.*, 1995). Es difícil comparar los datos de prevalencia e incidencia de la infección por VMV en los distintos países y regiones debido a que los estudios realizados se basan en diferentes pruebas serológicas (principalmente la Inmunodifusión en gel de agarosa o IDGA y el ensayo de inmunoabsorbancia enzimática o ELISA) y a la disparidad de los diseños y tamaños muestrales empleados (Tabla 3).

			Técnica	Nº Rebaños	Nº Animales	%Rebaños positivos	Prevalencia Individual	Referencia
AMÉRICA	EE.UU	Nebraska	ELISA	9	1.466	36,4%	48%	Keen, 1994
		22 Estados	ELISAc	682	21.369		24,20%	USDA, 2003
	Canadá	12 Provincias	ELISA	286	14.047	63%	19%	Simard y Morley, 1991
		Manitoba	ELISAc	77	2.207	25,10%	2,41%	Shuaib <i>et al.</i> , 2010
	Perú		IDGA	-	80	-	26%	Snyder <i>et al.</i> , 1983
	Argentina		IDGA	149	6380	5,37%	0,19%	Robles <i>et al.</i> , 2003
ÁFRICA	Marruecos	Zona Centro	ELISA	13	72	7,7%	2,70%	Mahin <i>et al.</i> , 1984
		Casablanca Kénitra Rabat	IDGA	(Estudio en matadero)	1000	-	24,80%	Bouljihad y Leipold, 1994
	Nigeria (Dos Estados)		ELISA	-	267	-	6,74%	Belino y Ezeifeka, 1984
EUROPA	Finlandia		ELISA	545	12931	1,6%	0,41%	Sihvonen <i>et al.</i> , 1999
	Dinamarca		-	-	-	30%	11%	(Hoff-Jørgensen, 1985)
	Polonia		IDGA	18	4284	-	24%	Kita <i>et al.</i> , 1990
	Alemania (Zona Norte)		ELISA	70	2229	51,2%	28,8%	Hüttner <i>et al.</i> , 2010
	Holanda		-	-	-	80%	30%	De Boer y Terpstra, 1974
	Austria		IDGA	68	883	-	9,5%	Hönger <i>et al.</i> , 1990
	Italia		IDGA	94	682	41,49%	13,64%	Caporale <i>et al.</i> , 1983
	Grecia (Zona Norte)		ELISA IDGA PCR	6	143	-	65% 37,80% 23,8%	Karanikolaou <i>et al.</i> , 2005
	Turquía	Norte	ELISA	-	583	-	23,50%	Albayrak <i>et al.</i> , 2011
		Zona Centro	ELISA	-	279	-	19,40%	Azkur <i>et al.</i> , 2011
		Noroeste	ELISA	-	542	-	15,3%	Preziuso <i>et al.</i> , 2010
		Sudoeste	ELISA	-	465	-	6,45%	Akkan <i>et al.</i> , 2009
	Siria		IDGA	-	1445	-	6%	Giangaspero <i>et al.</i> , 1993

Tabla 3. Resultados de los diferentes estudios de seroprevalencias de MV. ELISAc: ELISA de competición.

En los países del Norte de Europa, el MV se describió por primera vez en la década de los setenta, con porcentajes de rebaños seropositivos muy desiguales. En Dinamarca la seropositividad descrita fue de un 30% (Hoff-Jørgensen, 1985). En Holanda los porcentajes de infección obtenidos fueron sustancialmente más elevados, con un 80% de los rebaños infectados y el 30% de los animales seropositivos (De Boer y Terpstra, 1974), aunque tras ser los pioneros en establecer programas de control de la enfermedad desde el año 1982, han conseguido disminuir considerablemente estas prevalencias (Van Maanen *et al.*, 2010).

En Alemania se notificó por primera vez la presencia del VMV en el año 1967, en un rebaño de ovejas Merinas de aptitud cárnica (Seffner y Lippmann, 1967). Sin

embargo no es hasta el año 1969 cuando se empieza a investigar la enfermedad, después de que, tras la importación de 300 ovejas de raza Texel proveniente de los Países Bajos, los animales empezasen a desarrollar síntomas asociados al Maedi, (Straub, 1970). La enfermedad era ya muy conocida en Holanda en ese periodo y cuando se le preguntó a las autoridades holandesas por qué nunca habían reportado la presencia de esta enfermedad en su país y prohibido la exportación de tales animales, estos les respondieron que por qué razón deberían informar de ello si Alemania había exportado previamente los ovinos causantes de la epidemia en Islandia (Straub, 2004).

En Francia, el primer caso se describió a finales de los setenta (Savey *et al.*, 1981), lo que condujo a la implantación de normativas para el control oficial del MV en los centros de inseminación en 1988 (Brugère-Picoux, 2004) y a un sistema de acreditación a nivel nacional de explotaciones libres de MV en 1990, que permite diferenciar las ovejas certificadas como libres de MV para la exportación de aquellas certificadas para el comercio interior francés. Este sistema de acreditación se aplica únicamente en aquellos rebaños que venden corderos de recría para reposición. La clasificación depende fundamentalmente del número de animales testados: en el caso de animales para exportación se toman muestras de la totalidad del rebaño, mientras que el muestreo es aleatorio (50-60 ovejas del total) para movimientos dentro del propio país (Christodouloupoulos, 2006).

Los porcentajes de seropositividad del VMV descritos en los países mediterráneos son, en general, bastante elevados. En Grecia, la enfermedad del MV se conoce desde 1967 (Exarchopoulos, 1967) aunque el primer estudio serológico se realizó en la década de los 80 (Seimenis *et al.*, 1982, 1983). En Italia la enfermedad se describió por primera vez aproximadamente 15 años más tarde (Caporale *et al.*, 1983), encontrándose hoy en día tan diseminada por el país que es complicado encontrar rebaños seronegativos al VMV (Tolari, 2000; Christodouloupoulos, 2006). En Turquía, las seroprevalencias obtenidas empleando la IDGA como técnica diagnóstica resultaron muy dispares, oscilando entre el 1% y el 40% de los animales (Burgu *et al.*, 1994; Alkan y Tan, 1998; Yilmaz *et al.*, 2002; Cabalar y Kozat, 2004), mientras que los resultados obtenidos al emplear el ELISA fueron más homogéneos (Tabla 3).

Los diferentes estudios realizados en España muestran distintas seroprevalencias, detectándose el virus en la mayoría de las Comunidades Autónomas, independientemente de la raza explotada y el sistema productivo. El VMV se describió por primera vez en nuestro país en el año 1984, en un estudio sobre las enfermedades respiratorias crónicas más frecuentes que afectaban al ganado ovino de raza Latxa del País Vasco (González *et al.*, 1984). Como podemos observar en la Tabla 4, las seroprevalencias descritas en el norte son más elevadas, con valores más reducidos en el sur de la Península.

Comunidad Autónoma	% Rebaños Positivos	Técnica	Prevalencia Individual	Localización	Referencia
País vasco	99,2%	IDGA	52,4%	-	González, 1989a
	100%	IDGA	47%	-	Juste <i>et al.</i> , 1987
Aragón	95-97,8%	-	38,6-44,7%	Aragón, Sur de Navarra y Rioja	Luján <i>et al.</i> , 1993
	-	IDGA ELISA	15,31% 53,06%	Teruel	Abril <i>et al.</i> , 2004
	100%	ELISA(Innotest)	56%	Zaragoza, Huesca y Teruel	Biescas <i>et al.</i> , 2004
Madrid	43,4%	-	24,5%	-	García <i>et al.</i> , 1994
Castilla la Mancha	12%	IDGA	-	-	De la Cruz <i>et al.</i> , 1994
Castilla y León	96%	IDGA	66%	León	Sotelo <i>et al.</i> , 1995
	30%	IDGA	14,95%	Ávila	Reviriego, 1998
Murcia	28,3%	IDGA	9,09%	Caravaca	Prats y León, 1994
	6,6%	IDGA	1,2%	Moratalla	León y Prats, 1996
Navarra	89%	ELISAI Pourquier	26%	-	Ameztoy <i>et al.</i> , 1998
Andalucía	31%	ELISAI Pourquier	-	Sevilla	Artigas <i>et al.</i> , 1999
Asturias	-	ELISAI Pourquier	24%	-	Espí <i>et al.</i> , 2001
Cataluña	90%	ELISAI Elitest	58,3%	-	Alba <i>et al.</i> , 2008

Tabla 4. Resultados de los diferentes estudios de seroprevalencias de MV realizados en España (Leginagoikoa, 2010). ELISAI: ELISA indirecto.

A la luz de estos estudios podemos afirmar que, tal como ocurre en el resto de Europa, la infección por VMV no solo está presente en España, sino que los porcentajes de seroprevalencia son medios-altos en la mayoría de los casos, afectando tanto a razas de aptitud cárnica como láctea y a diferentes sistemas productivos. Sin

embargo, cabe señalar que los métodos y el número de muestras empleados en cada estudio fueron diferentes, por lo que comparar todos estos datos no es una tarea sencilla. Teniendo en cuenta estos elevados porcentajes de seroprevalencia, varias Comunidades Autónomas (Navarra, Aragón, País Vasco, Castilla León) están desarrollando esquemas oficiales de acreditación de rebaños libres de MV, aunque con carácter voluntario.

1.3.2. Importancia Económica

Existe un consenso general en reconocer que las infecciones por lentivirus generan pérdidas económicas significativas. Sin embargo, la bibliografía disponible ofrece información incompleta y en ocasiones contradictoria, por lo que deberían llevarse a cabo un mayor número de estudios con el fin de conocer con exactitud las consecuencias que ejerce el VMV sobre el bienestar animal y la economía de las explotaciones. Los trabajos realizados hasta la fecha revelan que el establecimiento de un programa de control y erradicación del MV tendría un notable impacto en las explotaciones de ovino; así en muchos países ya se han implementado programas de control obligatorios o voluntarios que permiten únicamente el movimiento de animales desde explotaciones libres de la enfermedad.

Aún así debemos tener en cuenta que la compleja interacción existente entre el virus, el hospedador y el ambiente, dificulta el estudio de las pérdidas económicas y su cuantificación (Peterhans *et al.*, 2004). Entre los factores que dificultan este estudio se encuentran:

1. **Curso lento de la enfermedad.** La disminución de la productividad está asociada sobre todo con aquellos animales con enfermedad subclínica, dado que el período de incubación del MV es generalmente más largo que la vida productiva de las ovejas (Keen, 1994). La aparición de síntomas clínicos aparece principalmente en edades avanzadas y solo en un 30% de los infectados, por lo que en explotaciones donde el desvieje se realiza a una edad anterior o donde los animales no son sometidos a situaciones que favorecen la observación de

los síntomas, como recorridos de cierta distancia, podría dificultarse la valoración de las pérdidas (Pritchard y Dawson, 2000; Peterhans *et al.*, 2004).

2. **Factores genéticos** tanto del hospedador como del virus, influyen en la diseminación de la enfermedad. Se ha determinado que la susceptibilidad a la enfermedad es diferente según la raza ovina (Cutlip *et al.*, 1986; Peterhans *et al.*, 2004); además, la patogenicidad del virus varía según la cepa considerada (Peterhans *et al.*, 2004).
3. **Las manifestaciones clínicas de la enfermedad podrían estar influidas por la presencia de infecciones concomitantes** (APO, parásitos pulmonares) que dependen de las condiciones oroclimáticas y las prácticas de manejo (González *et al.*, 1993; Peterhans *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta todas estas limitaciones, las pérdidas económicas causadas por el MV se han asociado tradicionalmente a:

1. **Aumento de la mortalidad**, lo que se traduce en un aumento en la tasa de reposición. Por ejemplo, durante el brote epidémico sufrido en Islandia a mediados del pasado siglo se describió una mortalidad del 20-30% (Sigurdsson *et al.*, 1952; Sigurdardóttir y Thormar, 1964). Sin embargo, la mortalidad suele ser baja en zonas enzoóticas donde el MV está fuertemente relacionado con la existencia de otras enfermedades concurrentes, el sistema de producción, la nutrición de los animales y otros factores ambientales (Peterhans *et al.*, 2004).
2. **Disminución de la vida media productiva del animal**. Las ovejas infectadas por el VMV presentan una pérdida progresiva de peso, con la consecuente disminución de la producción, aumentando así el riesgo de que el animal pueda ser eliminado de forma prematura del rebaño (Dohoo *et al.*, 1987; Bulgin, 1990; Keen *et al.*, 1997a; Radostits, 2000). De esta manera, los animales con VMV se eliminan un año antes que los-no infectados (Anderson *et al.*, 1985).

3. **Disminución del peso de los corderos al nacimiento:** varios trabajos afirman que la infección por MV disminuye el peso de los corderos al nacimiento (Snowder *et al.*, 1990a; Arsenault *et al.*, 2003) lo que tiene un efecto negativo en el posterior desarrollo de los animales, principalmente en rebaños con un alto grado de infección (Keen *et al.*, 1997b). Dos estudios realizados en América del Norte (Dohoo *et al.*, 1987; Keen *et al.*, 1997b) concluyeron que la infección está asociada con disminuciones de 0,15–0,4 kg al nacimiento. Por el contrario, en otros trabajos no se observó ninguna relación entre la infección y una menor condición corporal de los corderos (Snowder *et al.*, 1990a; Legrottaglie *et al.*, 1999; Arsenault *et al.*, 2003).
4. **Disminución del peso de los corderos en el destete:** se ha apreciado una disminución en la ganancia diaria de peso de los corderos en el período comprendido desde el nacimiento al destete (Dawson, 1987; Dungu *et al.*, 2000), que podría significar una pérdida de peso al destete de 0,3 a 3,0 kg por cordero. Esta disminución se ha relacionado con una menor producción de leche en las madres infectadas, más que a la acción directa del VMV sobre los corderos (Keen *et al.*, 1997a). Las pérdidas económicas asociadas podrían ser importantes (Pekelder *et al.*, 1994; Keen *et al.*, 1997b; Arsenault *et al.*, 2003), tanto por el aumento en el consumo de alimentos sólidos por parte de los corderos, como por el menor valor final de las canales. Aunque la bibliografía al respecto es amplia, hay poca uniformidad tanto en el diseño de los estudios como en los resultados obtenidos. Así, en EE.UU., Keen *et al.* (1997b) describieron que los corderos de ovejas seronegativas pesaban 0,59 kg más al destete realizado a los 56 días en comparación con los animales seropositivos del mismo rebaño; atribuyeron estos resultados a la menor ganancia de peso diaria y al menor peso al nacimiento de los corderos, así como al efecto acumulativo de la infección sobre la fertilidad de las ovejas. En un estudio realizado en Québec por Arsenault *et al.* (2003) empleando un mayor número de animales, se apreció también una reducción del peso de los corderos al destete (0,94 kg) asociado con la seropositividad de sus madres, aunque únicamente en los corderos de madres de 4 o más años. Dada la asociación

existente entre la enfermedad y la edad de los animales, es probable que este grupo de edad fuera el más afectado por MV. Por el contrario, en Canadá, Dohoo *et al.* (1987) no encontraron ninguna asociación entre el estado serológico de las ovejas y el peso de los corderos a los 30 y 47 días, aunque en este caso se utilizaron la fijación de complemento (FC) y la IDGA, que poseen mucha menor sensibilidad (Se) que el ELISA (Vitu *et al.*, 1982). En otros estudios realizados en Italia (Legrottaglie *et al.*, 1999) y EE.UU. (Snowder *et al.*, 1990b) tampoco se encontraron diferencias en los pesos de los corderos a los 20 y 120 días de edad, lo cual podría deberse a los rangos de edad utilizados; antes de los 20 días de edad la diferencia puede ser demasiado pequeña para detectarse, y después de los 80 días de edad los corderos pueden compensar la reducida producción de leche de sus madres con un aumento de la ingestión de pasto, ya que los corderos con ingesta baja de leche empiezan a consumir cantidades apreciables de alimento sólido a una edad más temprana (Penning y Gibb, 1979).

5. **Disminución de la producción láctea.** El VMV causa una mamitis indurativa que provoca una disminución en la producción, aunque se considera que solo un 10% de las pérdidas provocadas por esta enfermedad se deben a ello (Snowder *et al.*, 1990a; Peterhans *et al.*, 2004). El resto de las pérdidas están causadas por la menor capacidad metabólica del animal (Christodouloupoulos, 2005), producto de la disminución paulatina de condición corporal que se acentúa en los estados avanzados de la enfermedad. La vida productiva media del ganado ovino de leche es de 6-7 años; en este rango de edad podrían presentarse signos clínicos del MV, con un notable efecto negativo sobre la producción de leche. Sin embargo, en un estudio reciente realizado en Israel, en rebaños ovinos de Assaf con prevalencias entre 25-75%, no se observaron diferencias en la producción lechera entre animales seropositivos y seronegativos (Kenigswald y Van-Straten, 2009), lo que podría indicar que los efectos sobre la producción láctea podrían variar entre razas o incluso, cepas víricas implicadas. Asimismo, en muchas explotaciones de ganado ovino, y contrariamente a lo que ocurre en vacuno, no se realiza un control y registro de la producción láctea. Este hecho dificulta la obtención de resultados concluyentes, así como la existencia de

otros factores que pueden estar influyendo en la producción, sobre todo ambientales y de manejo. Un aspecto a tener en cuenta y que no ha recibido demasiada atención a lo largo de estos años, es el posible impacto de la infección por MV sobre la calidad de la leche. En un trabajo reciente en rebaños de ovino de leche infectados por el VMV se observó una disminución anual del 3,2% de la producción de leche y un 2% en el porcentaje de grasa (Christodouloupoulos, 2005). Del mismo modo, la infección podría actuar negativamente sobre la calidad de la leche al aumentar el recuento de células somáticas. Hoy en día los consumidores demandan productos que sean obtenidos de animales con el mejor estado sanitario posible, de modo que aquellos infectados por MV podrían llegar a ser considerados como una fuente no aceptable de leche para el consumo humano (Christodouloupoulos, 2005).

6. **Aumento de la mortalidad de los corderos en el período anterior al destete:** Arsenault *et al.* (2003) señalaron la existencia de una asociación estadísticamente significativa entre la seropositividad de las ovejas y la mortalidad de los corderos entre los 0-30 días de edad, puesto que las lesiones mamarias producidas por el VMV favorecerían la muerte por inanición de los corderos (Pekelder *et al.*, 1994). Por el contrario, existen otros estudios donde no se observó esta asociación (Gates *et al.*, 1978; Huffman *et al.*, 1981; Snowden *et al.*, 1990b; Keen *et al.*, 1997a), lo que puede deberse a una escasa reducción de la producción de leche, insuficiente para aumentar el riesgo de mortalidad.
7. **Consecuencias sobre el bienestar animal:** en este apartado nos referimos a aquellos aspectos de la infección que afectan directamente a la calidad de vida de los animales (Peterhans *et al.*, 2004). Se ha alcanzado el consenso de considerar que la infección por MV tiene un impacto significativo sobre el bienestar animal, reduciéndose la calidad de vida de los animales clínicamente afectados debido a la discapacidad y al dolor producido por la enfermedad (Peterhans *et al.*, 2004).

8. **Índices reproductivos (prolificidad y fertilidad)**: la infección por VMV puede causar un síndrome de agotamiento, asociado a una reducción de los índices reproductivos en ovino (Gates *et al.*, 1977). Algunos estudios han encontrado una menor fertilidad y prolificidad en animales seropositivos (Dohoo *et al.*, 1987; Dungu *et al.*, 2000) mientras que otros han concluido que la infección no se asocia con el tamaño de la camada (Gates *et al.*, 1978; Legrottaglie *et al.*, 1999; Arsenault *et al.*, 2003).

Estos datos demuestran que el MV genera pérdidas una vez se establece en un rebaño de ovino, pero pasan generalmente desapercibidas para el ganadero ya que no ocurren de forma drástica, si no que se instauran poco a poco, de manera paulatina, y se agravan con el paso del tiempo. Por otro lado debería homogeneizarse el diseño de estos estudios con el fin de clarificar y valorar económicamente las pérdidas generadas por el VMV.

1.3.3. Vías de Transmisión

Cualquier secreción de los órganos diana que contenga macrófagos infectados con el VMV es una fuente potencial de infección para otros animales, siendo las principales tanto las secreciones pulmonares (vía horizontal), como el calostro y la leche (vía lactógena) (Luján *et al.*, 1994; Christodoulopoulos, 2006; McNeilly *et al.*, 2008).

1.3.3.1. Transmisión Horizontal

Esta vía de transmisión implica el contacto de animales susceptibles con secreciones pulmonares con VMV, tanto de forma directa, por contacto con animales infectados, como de forma indirecta, a través de material infectado. Generalmente esta vía de transmisión se encuentra asociada a un contacto estrecho de los animales durante el confinamiento en los establos, agudizándose en el periodo invernal en explotaciones de tipo semiintensivo (Pálsson, 1976; De la Concha-Bermejillo, 1997). Por lo tanto, la eficacia de la transmisión por contacto se ve influenciada de forma indirecta por el manejo, el clima y el tipo de producción (Houwens, 1990). La

importancia del tipo de manejo en la transmisión de la enfermedad quedó patente en la epidemia islandesa donde, durante el invierno, los animales permanecían estabulados en pequeños cubículos sin apenas ventilación (Pálsson, 1976), lo que favoreció la rápida expansión de la infección. Houwers y Van Der Molen (1987), demostraron experimentalmente este hecho tras introducir dos animales infectados en un rebaño libre de la enfermedad; cinco años después el 83% de los individuos estaban infectados, de los cuales el 70% presentó lesiones en mama y/o pulmón. Varios trabajos realizados en España han puesto de manifiesto la estrecha relación existente entre la prevalencia del MV y la duración y condiciones de estabulación (Berriatua *et al.*, 2003; Leginagoikoa *et al.*, 2006a; Pérez *et al.*, 2010). Así, Pérez *et al.* (2010), observaron una asociación entre la seropositividad y el periodo de estabulación y el grado de ventilación de la nave, que apoya la hipótesis de que el riesgo de infección por VMV se reduce con una mejor aireación de la nave (Leginagoikoa *et al.*, 2006a) y con menores periodos de estabulación (Leginagoikoa *et al.*, 2006b, 2010).

En cuanto a la transmisión indirecta a través de material contaminado, su importancia epidemiológica no está todavía completamente demostrada. Pálsson (1976) la considera ocasional, mientras que Sigurdsson *et al.* (1953), tras administrar agua contaminada con heces de animales positivos, fueron capaces de infectar cuatro de cinco corderos. Sin embargo, nunca se ha descrito el aislamiento del VMV a partir de heces de animales infectados (Gudnadottir y Pálsson, 1965) y los resultados de aislamiento del virus de orina son poco coherentes (Houwers, 1990), aunque se ha detectado en tejido renal (Angelopoulou *et al.*, 2006).

Es importante tener en cuenta que las condiciones higiénico-sanitarias en el rebaño y en concreto la presencia de otras afecciones respiratorias que favorezcan la tos y la descarga nasal, como por ejemplo las bronconeumonías verminosas o la adenomatosis pulmonar ovina, pueden contribuir a la diseminación de VMV por esta vía (Pálsson, 1976; Straub, 1985; Dawson *et al.*, 1990; González *et al.*, 1993; Luján *et al.*, 1994; Pepin *et al.*, 1998).

1.3.3.2. Transmisión Lactógena

La mama es uno de los órganos diana del virus, habiéndose identificado a partir de lesiones de tejido mamario (Cutlip *et al.*, 1981; Kennedy-Stoskopf *et al.*, 1985), así como en calostro y en leche, por lo que pueden actuar como fuente de infección de la enfermedad (Sihvonen, 1980; Cutlip *et al.*, 1985a; Ouzrout y Lerondelle, 1990). En el trabajo realizado por Sihvonen (1980) se demuestra que el virus está presente en la leche de las madres infectadas, ya que logró cultivar el VMV a partir de células de leche obtenida entre la tercera y octava semana postparto de ovejas infectadas experimentalmente tres años antes. Asimismo, Ouzrout y Lerondelle (1990), mediante cultivo, lograron aislar el virus a partir de células de calostro de una oveja gestante seropositiva y concluyeron que el VMV se aislaba con mayor facilidad a partir del calostro que de la leche. En un principio se consideró que las únicas células infectadas eran los monocitos/macrófagos (Brodie *et al.*, 1995), actuando como reservorios del virus. De ahí que Ouzrout y Lerondelle indicaran que sus resultados eran debidos a que en el calostro existe una mayor cantidad de macrófagos en relación con la leche, aunque también señalaron que podría deberse a la acción de los corticoides liberados al final de la gestación que podrían favorecer la expresión del virus dentro de las células diana. Posteriormente se demostró que además de los macrófagos, las células epiteliales en calostro y leche pueden ser también una fuente de infección: Bolea (1998) apreció que las células epiteliales de la glándula mamaria son permisivas a la infección y replicación del VMV, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. De modo similar, Mselli-Lakhal *et al.* (1999) comprobaron que las células epiteliales derivadas de la leche de una cabra con VAEC estaban infectadas y permitían la expresión del virus en cultivos celulares. La replicación del VMV se produce tras la activación de estas líneas celulares, hecho que se ve favorecido por respuestas de tipo hormonal, como ocurre en el inicio de la lactación (Lerondelle *et al.*, 1999). De modo adicional, la transmisión se favorece en aquellos animales con cuadro mamítico debido al reclutamiento de células mononucleares infectadas en las glándulas mamarias (Zink y Johnson, 1994). La cría puede infectarse con la primera toma de calostro infectado debido a la elevada permeabilidad que su intestino presenta en las primeras horas de vida (Pepin *et al.*, 1998), por lo que esta vía constituye una importante fuente de

infección para los corderos. También está bien descrita la importancia de esta vía de transmisión para el VAEC (Ellis *et al.*, 1983; Adams *et al.*, 1983); se ha demostrado la presencia de virus tanto en células como en sobrenadante lácteo, así como la posibilidad de inactivarlo en el calostro por calentamiento a 56°C durante 60 minutos (Adams *et al.*, 1983; Ravazzolo *et al.*, 2006). Preziuso *et al.* (2004) detectaron la presencia de antígenos del VMV en el citoplasma de monocitos/macrófagos de calostro, en células epiteliales de la lámina propia del intestino delgado y en las placas de Peyer, en donde podrían alcanzar los linfonodos mesentéricos por vía linfática. Un estudio filogenético de secuencias nucleotídicas de la región *env* de virus procedente de calostro y sangre demuestra la compartimentalización de los LVPR; las células epiteliales parecen infectarse con variantes específicas indicando que la transmisión lactógena se asociaría a determinadas cepas de virus y que podrían ser distintas a las detectadas en la sangre (Pisoni *et al.*, 2007b).

1.3.3.3. **Importancia Epidemiológica de las dos vías de transmisión**

En los últimos años se ha creado cierta controversia en cuanto a la importancia relativa de las dos rutas y su papel en la epidemiología de la enfermedad. Los primeros estudios focalizaron su atención en la vía lactógena, como el realizado por De Boer y Houwers (1979), que estudió la posible relación entre el tiempo que los corderos permanecían con sus madres tras el parto y su riesgo de infección con el VMV, tomando como población de estudio un rebaño en régimen de estabulación continua. Los resultados obtenidos mostraron que el porcentaje de corderos infectados era mayor cuanto más tiempo permanecían con la madre; los autores concluyeron que la vía lactógena debía poseer una gran importancia en la epidemiología del MV. Sin embargo, los resultados no fueron concluyentes debido al diseño del estudio, puesto que todos los corderos estudiados, tanto los que permanecieron con la madre como aquellos que se integraron en el rebaño adulto, estuvieron expuestos tanto a la vía lactógena como a la horizontal. Otro estudio que intentó aportar nueva información fue el llevado a cabo por Straub en 1983 en un rebaño con elevada seroprevalencia de MV. Al nacimiento, los corderos se separaron en cuatro grupos según el tipo de amamantamiento y el tiempo de permanencia con la madre. Únicamente se observó

seroconversión en los corderos que se criaron con la madre hasta una edad de 3-6 meses.

Posteriormente surgió una nueva teoría: la vía lactógena es una fuente de infección importante para los corderos, pero su efecto se diluye en etapas posteriores si no se previene la vía horizontal. Así, Houwers y Nauta (1989) observaron que, con el paso del tiempo en rebaños estabulados, el contagio horizontal del VMV reduce las diferencias iniciales en la tasa de infección debidas a la transmisión lactógena, llegando a la misma conclusión en estudios realizados en cabras infectadas con VAEC (East *et al.*, 1987; Rowe *et al.*, 1992). En España, Álvarez *et al.* (2006) apreciaron que el calostro de madres seropositivas es una fuente muy importante de infección para el VMV, sobre todo si se administra con biberón, pero los beneficios obtenidos por suministrar a los corderos una alimentación libre de virus pueden reducirse debido a una transmisión horizontal eficiente entre los corderos durante los primeros meses de vida. Leginagoikoa *et al.* (2006a) van más allá y señalan que la cría de los corderos de modo artificial y separándolos del resto del rebaño durante el primer año de vida sería de escaso valor en términos de control de la enfermedad, si posteriormente estos animales se introducen en un rebaño con media o alta prevalencia.

Varios trabajos publicados recientemente profundizan un poco más en el tema, y señalan que la seroconversión es independiente del modo de cría antes del destete, de modo que la seropositividad está asociada al estado serológico de la madre frente al virus (Berriatua *et al.*, 2003; Leginagoikoa *et al.*, 2010). Hay autores que afirman que la descendencia de animales seropositivos adultos tiene un mayor riesgo de seroconvertir que la descendencia de animales seropositivos más jóvenes (Sihvonen *et al.*, 1980b). En el estudio realizado por Scheer-Czechowski *et al.* (2000), se concluyó que los corderos nacidos de ovejas seropositivas tenían 7,6 veces más riesgo de seroconvertir en los dos primeros años de vida que aquellos nacidos de ovejas seronegativas, lo que podría indicar la existencia de un importante componente hereditario en la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad. Además, no hay pruebas de que la infección lactógena aumente el riesgo de infección por MV en condiciones que permitan una transmisión horizontal eficiente; es más, parece que los animales jóvenes presentan una mayor susceptibilidad a la infección y que podrían

excretar una mayor cantidad de virus en sus secreciones, avalando la teoría de que la transmisión lactógena no es esencial en el mantenimiento de la enfermedad en el rebaño (Pérez *et al.*, 2010).

1.3.3.4. **Otras vías de transmisión**

Existen otras vías de transmisión de la enfermedad, aunque poseen una menor importancia epidemiológica. Una de ellas es la transmisión intrauterina, descrita por vez primera por Cross *et al.* (1975) tras observar lesiones pulmonares atribuibles al VMV en dos de once corderos nacidos por histerectomía en madres seropositivas. Posteriormente, Cutlip *et al.* (1981) lograron aislar el virus en 2 de 35 corderos nacidos de madres seropositivas a VMV y en 1 feto de un total de 17, todos ellos obtenidos de ovejas seronegativas que habían estado en contacto con animales seropositivos. Además de estos trabajos, Brodie *et al.* (1994), mediante PCR, lograron detectar el virus en un 11% de los corderos recién nacidos y separados inmediatamente de la madre tras el parto. Por el contrario, en el estudio realizado por De Boer *et al.* (1979), ninguno de los corderos separados de sus madres infectadas al nacimiento seroconvirtió posteriormente, de modo que los autores concluyeron que en caso de ocurrir, la transmisión intrauterina poseía una baja significación epidemiológica.

Experimentalmente se ha evidenciado la capacidad del VMV de infectar tejidos fetales mediante su inoculación directa en el feto (Tuboly *et al.*, 1991) o en el saco amniótico (Cutlip *et al.*, 1982), lo que desencadena la reabsorción fetal si la infección se produce antes de los 60 días de gestación. En ambos casos se hallaron cúmulos de células linfoides típicas de infección por VMV en los pulmones y se logró aislar el virus a partir de los tejidos. También se ha comprobado experimentalmente la posibilidad de infectar con LVPR embriones de cabra en estadio de 8-16 células, siempre y cuando la zona pelúcida del embrión esté destruida, ya que cuando está intacta protege a las células embrionarias de la infección por VAEC (Lamara *et al.*, 2002). Sin embargo, en otros estudios no se ha conseguido demostrar la presencia del virus en fetos o neonatos de madres infectadas (Gudnadottir, 1974; De Boer *et al.*, 1979; Sihvonen, 1980), por lo que se cree que, aunque la infección intrauterina es posible, no se considera una ruta de transmisión esencial (Blacklaws *et al.*, 2004).

La transmisión venérea ha sido poco estudiada. El cruce con ovejas no infectadas con carneros infectados con VMV, siempre y cuando no compartieran el mismo establo, no provocó seroconversión en las hembras (Krogstad y Udnes, 1978). Adams *et al.* (1983) obtuvieron los mismos resultados en un estudio realizado con machos cabríos infectados con VAEC. Todavía no se ha demostrado que los LVPR puedan transmitirse vía coital, pero sí se han observado lesiones asociadas al VMV en testículos de carneros infectados con VMV y con lesiones típicas en el pulmón (Palfi *et al.*, 1989). Además, De la Concha-Bermejillo *et al.* (1996), demostraron que la epididimitis provocada por *Brucella ovis* facilita la eliminación del VMV en el semen. También se ha detectado la presencia de VAEC en fluido seminal y células no espermáticas en machos cabríos infectados experimentalmente (Travassos *et al.*, 1998). Otros autores resaltan la presencia intermitente de DNA proviral en el semen y tejidos del tracto genital masculino de carneros y machos cabríos infectados de forma natural (Peterson *et al.*, 2007; Ali Al Ahmad *et al.*, 2007b; Ramírez *et al.*, 2009), si bien la importancia de los machos en la transmisión parece más relacionada por el contacto horizontal asociado a la práctica tradicional de intercambiar machos entre los rebaños, más que con la importancia de la vía de transmisión seminal.

La transmisión por transferencia embrionaria carece de importancia epidemiológica debido a las bases actuales de la “Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones”, donde los embriones empleados deben proceder de rebaños seronegativos y sujetos a protocolos de lavado (Blacklaws *et al.*, 2004). En un trabajo realizado por Fieni *et al.* (2002), se obtuvo ADN proviral de LVPR en las células del oviducto, aunque trabajos posteriores realizados tanto en cabras infectadas con VAEC (Ali Al Ahmad *et al.*, 2005) como en ovejas con VMV (Cortez *et al.*, 2006) demostraron la presencia de DNA proviral en células del *cumulus oophorus* pero no en los oocitos libres. Cabe destacar que se ha conseguido obtener embriones libres de VAEC y oocitos libres de VMV a partir de hembras infectadas (Cortez *et al.* 2006, Ali Al Ahmad *et al.* 2007a).

En cuanto a la transferencia mecánica durante el ordeño es una posibilidad que Lerondelle *et al.* confirmaron de forma experimental en 1995, aunque gracias a los

protocolos y la higiene en el ordeño, no se ha registrado ningún caso en condiciones de campo.

En cuanto a la forma iatrogénica, se desconoce su importancia en la transmisión de los LVPR. Dawson (1987) realizó, sin éxito, infecciones experimentales inyectando subcutáneamente a ovejas sanas sangre heparinizada de ovejas infectadas.

1.3.4. Factores de Riesgo de la Enfermedad

Los factores de riesgo que determinan la aparición y evolución de la enfermedad se asocian a lo que hoy en día se conoce como tríada ecológica, constituida por el hospedador, el agente causal y el medio ambiente (Thrusfield, 2005). El paso de un estado de salud a un estado de enfermedad se debe a la ruptura del equilibrio existente entre estos tres elementos. Rara vez un solo factor es capaz de provocar una enfermedad, siendo ésta el resultado de la interacción de varios factores (Figura 5).

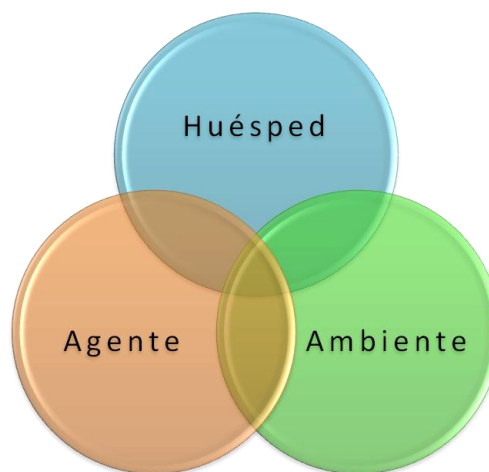


Figura 5. Tríada ecológica.

Por este motivo analizaremos los factores de riesgo del MV según se encuentren asociados al hospedador, al agente causal o al ambiente, siendo su conocimiento esencial a la hora de establecer un programa de control y erradicación de la enfermedad.

1.3.4.1. Factores Asociados al Hospedador

Dentro de estos factores nos encontramos la especie, la raza, la edad, el sexo y la presencia de enfermedades concomitantes.

En cuanto a la **especie**, tradicionalmente se considera que el VMV afecta de forma natural a ovejas, mientras que las cabras son menos susceptibles a la infección natural por este virus. Sin embargo, datos recientes ponen en duda esta afirmación. Vogt *et al.* (1999) demostraron que las cabras pueden infectarse de forma natural por contacto con ovejas con VMV y Shah *et al.* (2004b) obtuvieron, de forma similar, evidencias de que existe transmisión natural del subtipo A4 de los LVPR de cabras a ovejas y viceversa. Además, otros muchos autores han demostrado la infección experimental de cabras con VMV (Banks *et al.*, 1983; Cutlip *et al.*, 1991). Cutlip *et al.* (1991) infectaron conejos con VMV, sin embargo no fueron capaces en otras especies domésticas como el pollo, la vaca, el caballo, el cerdo, el perro y el hámster, ni en especies silvestres como el ciervo, la rata y el ratón. La nueva clasificación de los LVPR ya tuvo en cuenta este hecho al considerar el genotipado de las cepas víricas aisladas, lo que condujo a un cambio sustancial en la epidemiología clásica o histórica del VMV. Así, en el subtipo A4 de la clasificación de los LVPR realizada por Shah (2004a) se engloban secuencias tanto de cabras como de ovejas que apoyan la transmisión natural entre ambas especies (Shah *et al.*, 2004b). En trabajos recientes en los que se han aplicado técnicas moleculares, se ha observado que en rebaños mixtos de cabras y ovejas los aislados de ambas especies pertenecen a subtipos tipo VAEC como el B1 (Grego *et al.*, 2007; Pisoni *et al.*, 2007a) y el C (Gjerset *et al.*, 2008). El primer aislamiento de VMV que se secuenció completamente en España se realizó a partir de ovinos que presentaban cuadro articular, observándose que los virus aislados mostraban una mayor correlación con aislados tipo VAEC que con los de tipo VMV descritos anteriormente en España (Reina *et al.*, 2006), clasificándose dentro del grupo B2 tipo VAEC (Glaria *et al.*, 2009).

En cuanto a la existencia o no de un componente de **susceptibilidad o resistencia racial** a la infección, los datos obtenidos no son uniformes, si bien en trabajos recientes realizados por Berriatua *et al.* (2003) y Leginagoikoa *et al.* (2010) se

sugiere la existencia de un componente hereditario de resistencia a la enfermedad, ya que los animales nacidos de madres seronegativas tienen menor riesgo de seroconvertir independientemente del modo de cría antes del destete. De Boer y Houwers (1979) sostienen que la raza Texel es particularmente susceptible a padecer MV, con una morbilidad del MV clínico del 10-20%. En un estudio retrospectivo en ovejas de las razas Border Leicester (BL) y Columbia infectadas de forma natural y experimentalmente con el VMV, Cutlip *et al.* (1986) observaron que los síntomas clínicos y lesiones atribuibles al virus aparecían con mayor frecuencia y gravedad en las ovejas de raza BL. Pálsson (1976) señala que los cruces entre ovinos islandeses y BL parecen ser más resistentes a la infección que otras razas. Houwers y Nauta (1989) observaron una menor susceptibilidad a la infección de las ovejas Ile de France (IF) respecto a las de raza Finnish Landrace (FL). Por el contrario, Snowden *et al.* (1991) observaron que la susceptibilidad a la infección era similar en ovejas de las razas Rambouillet, Targhee, Columbia y Polypay pertenecientes a un mismo rebaño. Por otro lado, las ovejas de pura raza Awassi parecen ser muy susceptibles a la infección por VMV, pero resistentes al desarrollo de cuadros clínicos (Perk, 1995). En un trabajo realizado en España, se observó que la seroprevalencia de VMV en ovejas Latxa cara negra era mayor que en las Latxa cara rubia; además, sus cruces con Rasa Aragonesa, Castellana y Manchega de aptitud cárnica presentaron porcentajes más reducidos (González, 1989a).

En cuanto a la **edad**, son susceptibles a la infección por el VMV ovejas de todas las edades (Gudnadottir y Pálsson, 1965; Cutlip *et al.*, 1982; Sihvonen *et al.*, 1980b). En muchos estudios se ha observado una correlación positiva entre el riesgo de infección y la edad, pero se desconoce si existe un componente de susceptibilidad asociado a la misma. La mayoría de los autores atribuyen esta relación a que los animales viejos han tenido más posibilidades de entrar en contacto el virus (Light *et al.*, 1979; Dohoo *et al.*, 1987; González, 1989a; Snowden *et al.*, 1990a; Simard y Morley, 1991; Cutlip *et al.*, 1992; Keen *et al.*, 1997b). El patrón de seroconversión asociado a la edad difiere según los estudios, pero varios autores describen un aumento progresivo de la seroprevalencia al VMV hasta los 3-4 años, con un comportamiento posterior que varía según los estudios (Keen *et al.*, 1997b; Berriatua *et al.*, 2003). Otra característica a

tener en cuenta es que los animales más viejos muestran un mayor potencial transmisor, siendo la principal fuente de VMV para los animales más jóvenes (De Boer *et al.*, 1979; Stevenson y Bouffard, 1984). Otros autores han señalado que la descendencia de ovejas adultas seropositivas parece seroconvertir en mayor grado que la de las jóvenes seropositivas (Sihvonen, 1980; Berriatua *et al.*, 2003).

Hasta el momento no se ha demostrado una asociación entre el **sexo** y la susceptibilidad o resistencia a la infección por VMV (Cutlip *et al.*, 1992), y en el caso de observarse, se atribuyó al distinto manejo al que se someten machos y hembras en la mayoría de los rebaños (Simard y Morley, 1991; Ayelet *et al.*, 2001).

Otro factor considerado por numerosos autores es el **estado sanitario de los animales**, puesto que la existencia en el rebaño de enfermedades concomitantes podría favorecer la infección por VMV. La Adenomatosis Pulmonar Ovina (APO) es la enfermedad descrita con mayor frecuencia como facilitadora de la infección por el VMV (Snyder *et al.*, 1983; Dawson *et al.*, 1985, 1990; Pritchard y Done, 1990; González *et al.*, 1993), probablemente porque los animales con esta enfermedad presentan una mayor cantidad de macrófagos alveolares susceptibles de infectarse con VMV y además eliminan abundante moco bronquial cargado de macrófagos infectados que podría favorecer la formación de aerosoles con VMV (Dawson *et al.*, 1990; Pritchard y Done, 1990; González *et al.*, 1993). Del mismo modo es posible que la presencia de otras infecciones secundarias en el pulmón y/o la mama, favorezcan la eliminación y transmisión de VMV (Houwens, 1990; Zink y Johnson, 1994). Entre ellas destacan las infecciones por **nematodos broncopulmonares**, muy comunes en estos animales de renta. Las bronconeumonías verminosas son enfermedades parasitarias producidas por nematodos pulmonares de las familias Protostrongylidae (*Muellerius capillaris*, *Neostrongylus linearis*, *Cystocaulus ocreatus* y *Protostrongylus* spp.) y Dictyocaulidae (*Dictyocaulus filaria*), y aparecen con mucha frecuencia en el ganado ovino y caprino mantenido en régimen de pastoreo. Ambas familias, de distribución mundial, muestran diferencias marcadas respecto a su localización en el pulmón, acción patógena y sensibilidad a los antihelmínticos, además de tener ciclos biológicos externos e internos distintos. Con frecuencia en un mismo animal se pueden encontrar dos o más especies de nematodos broncopulmonares al mismo tiempo. El porcentaje

de parasitación de los ovinos en Galicia varía considerablemente entre explotaciones, pero en la mayoría, el número de animales que eliminan larvas en heces supera el 30%, alcanzando en algunos incluso el 80-90%; estos porcentajes serían netamente superiores si se realizara un examen directo de las lesiones pulmonares tras el sacrificio (Morrondo *et al.*, 1999). Giangaspero *et al.* (1993) obtuvieron una correlación positiva entre la seropositividad al MV y la parasitación por *C. ocreatus*, *N. linearis* y *M. capillaris*, aunque en el caso de *D. filaria* y *P. rufescens* esta asociación no fue estadísticamente significativa. Estos datos sugieren un sinergismo entre los parásitos broncopulmonares y el VMV, aunque cabe señalar que la técnica empleada para la detección del MV fue el IDGA, poco sensible, y que la prevalencia fue solamente del 5,6%, siendo más elevada la presencia de parásitos broncopulmonares. En un trabajo reciente realizado en España en el que se estudiaron ovejas coinfectadas de MV y Scrapie, se ha observado que las lesiones inducidas por el virus en mama, pulmón y folículos linfoides favorecen el depósito de PrPSc (proteína priónica scrapie) en estas localizaciones, no considerados órganos diana en el Scrapie (Salazar *et al.*, 2010).

1.3.4.2. **Factores Asociados al Agente Causal**

En cuanto a los factores asociados al agente causal, los que se nombran en la bibliografía son la cepa vírica y el tropismo celular de la misma.

Parece que existen cepas víricas de lentivirus ovinos con distinta citopatogenicidad y capacidad replicativa (Lairmore *et al.*, 1986, 1987) y se cree que tanto la cepa como la dosis viral podrían influir en la expresión de la enfermedad (Quérat *et al.*, 1984; Lairmore *et al.*, 1986, 1987; Smith, 1992).

Quérat *et al.* (1984), en ovinos infectados de forma natural, consiguieron aislar cepas de VMV con distinta capacidad lítica en cultivos celulares, aunque éstas provinieron de distintos individuos y en ningún caso se aislaron cepas distintas en un mismo animal. Por otro lado, en cepas mantenidas en cultivos celulares, sólo aquellas con menos de diez pases fueron capaces de inducir lesiones, lo que demuestra la existencia de una relación positiva entre el grado lesional y la dosis viral (Lairmore *et al.*, 1986). Hay que destacar que la patogenicidad de las cepas también varía *in vivo* o *in vitro* y según el tipo de tejido empleado en el cultivo celular. Así, Lairmore *et al.*

(1987) observaron que dos cepas que causaban lisis en cultivos de células de membrana sinovial de cabra diferían en su efecto citopático sobre macrófagos alveolares en cultivo. Uno de los aislados causaba una rápida fusión de las células y era altamente patogénico *in vivo* mientras que la otra cepa mostraba poco efecto citopático sobre macrófagos alveolares y ningún efecto patogénico *in vivo*. Estos datos sugieren que la extensión de la replicación viral y el grado de citopatogenicidad podían ser importantes marcadores de la virulencia de las distintas cepas del virus, considerando de este modo la existencia de cepas “rápidas/altas” y “lentas/bajas” según su replicación y virulencia, respectivamente (Lairmore *et al.*, 1987, 1988).

Atendiendo a la patología que provocan las distintas cepas, existen cepas con tropismo por el sistema nervioso, otras con mayor afinidad por el pulmón, las articulaciones o la mama. Andrésdóttir *et al.* (1998), en infecciones experimentales, observaron que la virulencia sobre células del SNC era mayor en cepas de VMV aisladas de un animal con síntomas nerviosos que en cepas de VMV de origen pulmonar. Además las cepas de origen nervioso crecieron más rápidamente en cultivos de plexo coroideo que las cepas aisladas del pulmón, pero ambas crecieron de modo similar en cultivos de macrófagos. Sin embargo, Craig *et al.* (1997) lograron obtener una cepa neurovirulenta a partir de un aislado de campo no neurovirulento, tras varios pases *in vivo*, por inoculación intracerebral. Cuando se inoculó la cepa por vía intravenosa, subcutánea o en la médula ósea no obtuvieron este resultado, sugiriendo que la cepa era neuropatógena pero no neuroinvasiva.

1.3.4.3. **Factores Asociados al Ambiente**

Dentro de los factores ambientales que pueden favorecer la diseminación de la enfermedad, se puede hablar del **macroclima** asociado a una zona geográfica particular y del **microclima** asociado al establo. Teniendo en cuenta las vías de transmisión descritas, cabría esperar que ambos ejercieran cierta influencia sobre la difusión de la enfermedad, por ejemplo, en la formación de aerosoles y la diseminación del virus (Houwens, 1990). Tal y como mencionan algunos autores, los lugares secos y calurosos podrían facilitar la transmisión horizontal del VMV, ya que los animales se juntarían en zonas sombrías para evitar la luz solar directa (Ferrer, 1996).

Además, las condiciones meteorológicas de una determinada zona podrían influir de forma indirecta en la diseminación de la enfermedad al condicionar en cierta medida el manejo realizado en el rebaño, habiéndose identificado determinadas prácticas que conducen a la aparición de mayores seroprevalencias.

No existen muchos datos sobre la influencia del **microclima** de la explotación en la transmisión de la infección. En un trabajo reciente realizado por Pérez *et al.* (2010) donde se tuvo en cuenta el diseño de las naves, se observó un menor riesgo de infección por el VMV en aquellas naves mejor ventiladas. Otro factor importante a tener en cuenta es el espacio disponible por animal, ya que situaciones que favorecen el hacinamiento de los animales se asocian a una mayor seroprevalencia del VMV (Dawson, 1980; Houwers, 1990).

Uno de los factores intrínsecos de cada rebaño que se asocian con la seroprevalencia del MV es la intensidad y la **orientación productiva**. Los datos publicados muestran mayores porcentajes de infección por VMV en rebaños de producción intensiva. Tradicionalmente el nivel de intensificación se relaciona de forma indirecta con la orientación productiva del rebaño, hecho que podía explicar las mayores seroprevalencias obtenidas en rebaños de aptitud láctea en relación con los de carne (González *et al.*, 1984; Leginagoikoa *et al.*, 2006b; Alba *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2010). Muchos autores han encontrado una asociación entre una estabulación prolongada y una mayor seroprevalencia del VMV (Dawson, 1980; Houwers, 1990; Leginagoikoa *et al.*, 2010), lo que podría explicar en parte las mayores prevalencias de la enfermedad en los sistemas de cría intensivos.

Otro de los factores de manejo asociados con la seroprevalencia del MV es el **tamaño del rebaño**; los más grandes presentan seroprevalencias más altas (Simard y Morley, 1991; Cutlip *et al.*, 1992; Keen *et al.*, 1997b; Arsenault *et al.*, 2003). Esta asociación podría deberse a que los rebaños más grandes suelen ser más intensivos y, por lo tanto, con periodos de estabulación más prolongados, además de tener mayor intercambio de animales, hechos que podrían favorecer la infección en el rebaño (Berriatua *et al.*, 2003).

En lo referente al **manejo de la recría**, tradicionalmente se ha considerado que la cría de corderos con calostro y leche libre de LVPR durante la lactancia reduce el riesgo de infección, al menos a corto plazo (Cutlip y Lehmkuhl, 1986). Sin embargo, como ya se ha mencionado con anterioridad, trabajos recientes muestran independencia entre la seropositividad y el tipo de cría antes del destete (Berriatua *et al.*, 2003; Leginagoikoa *et al.*, 2010). Otro factor relacionado con la el manejo de la recría sería el estado serológico de la madre frente a la enfermedad (Scheer-Czechowski *et al.*, 2000; Berriatua *et al.*, 2003; Leginagoikoa *et al.*, 2010) y la edad a la que se produce el destete de los corderos, ya que un aumento en la edad al destete se asocia con una mayor seropositividad a MV (De Boer *et al.*, 1978; Keen *et al.*, 1997b).

1.4. PATOGENIA

Entendemos por patogenia aquellos cambios, reacciones celulares y otros mecanismos patológicos que se dan en el desarrollo de una enfermedad, englobando el estudio de la relación entre la causa y las lesiones producidas, y entre éstas y los signos clínicos (Blood y Studdert, 1988). En el caso particular del VMV, el estudio de la patogenia incluye tanto la entrada y replicación del virus en las células diana, visto anteriormente, así como las razones que explican el curso lento de la infección, la persistencia del virus en el organismo, la respuesta inmune generada en el hospedador y la naturaleza y mecanismos de las lesiones producidas (Coffin, 1996a; Pepin *et al.*, 1998).

Una de las características más notables de la infección por el VMV es su persistencia en el hospedador, de modo que los animales infectados son un reservorio permanente del virus (Cutlip *et al.*, 1988). Sin embargo, es necesario que transcurran varios meses o incluso años tras la infección para que se produzca la sintomatología clínica, es decir, el virus posee un periodo de incubación largo y muy variable, siendo el resultado final una infección persistente con desenlace fatal (Knowles, 1997). Esto se debe a que la respuesta inmune que se genera frente a la infección es insuficiente para eliminar el virus (Pepin *et al.*, 1998). Tradicionalmente se habla de seis fases desde que ocurre la infección hasta la muerte del animal (Figura 6):

1. Viremia: tras la infección se produce una viremia que se mantiene a lo largo de toda la vida del animal. En esta fase se observa VMV libre e integrado en monocitos circulantes y se acompaña de alteraciones inmunopatológicas (Begara *et al.*, 1996; Clements y Zink, 1996). Los animales infectados podrían detectarse mediante la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Álvarez *et al.*, 2006; Leginagoikoa *et al.*, 2006b).
2. Seroconversión: Una vez en los órganos diana, el virus aprovecha la maduración de los monocitos a macrófagos para replicarse (Narayan *et al.*, 1983) y este proceso se acompaña de una respuesta inmune por parte del hospedador (Sihvonen, 1981) que es capaz de reducir inicialmente la replicación vírica pero que no elimina el virus completamente (Amorena *et al.*, 2001). Como ya se ha mencionado anteriormente, se habla de la estrategia del “caballo de Troya” porque el virus permanece acantonado en las células y órganos diana escapando de la respuesta inmune humoral y celular con diferentes grados de éxito en función de la cepa infectante y del perfil genético individual (Lairmore *et al.*, 1988; De la Concha-Bermejillo *et al.*, 1995). El periodo de tiempo entre la infección y la seroconversión puede variar desde dos semanas (Saman *et al.*, 1999) a varios meses (Oliver *et al.*, 1981b; Larsen *et al.*, 1982), y en ocasiones puede incluso no tener lugar (Sihvonen, 1981; Johnson *et al.*, 1992). Ésta característica debería tenerse en cuenta a la hora de instaurar cualquier programa de control y erradicación de la enfermedad (De la Concha-Bermejillo, 1997). Sin embargo, durante este periodo, los macrófagos infectados si inducen la producción de citoquinas, así como la infiltración leucocitaria, generándose la lesión intersticial que caracteriza a esta enfermedad (Narayan y Clements, 1989).
3. Aparición de lesiones.
4. Presencia de síntomas clínicos, en cualquiera de sus formas.
5. Muerte del animal.

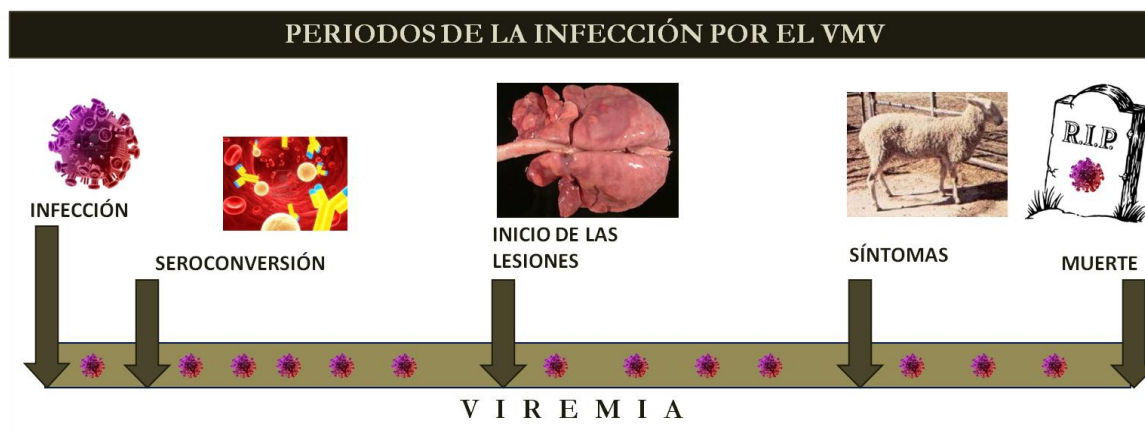


Figura 6. Periodos de la infección por el VMV.

1.4.1. Mecanismos Patogénicos

El mecanismo preciso por el cual el virus causa inflamación en los distintos tejidos diana es desconocido, aunque la alteración en la regulación de la expresión de las citoquinas en los macrófagos ha sido postulada como un posible mecanismo de mantenimiento y exacerbación de la inflamación (Lechner *et al.*, 1997b; Woodall *et al.*, 1997). En los tejidos podría ocurrir un fenómeno similar al observado por Zink *et al.* (1987) en cultivos celulares. Estos autores expusieron linfocitos de oveja a macrófagos infectados por el VMV y observaron que se liberaba un interferón lentiviral (IFN-LV) que inducía la expresión de antígenos de clase II del CMH en los macrófagos y además retardaba el grado de maduración de los monocitos y por tanto la replicación del virus en los macrófagos. Estas propiedades contribuyen a la inducción de la respuesta linfoproliferativa del hospedador frente al virus. Por otra parte Zhang *et al.* (2002), encontraron una asociación entre el incremento en la expresión de determinadas citoquinas y la seropositividad de los animales al VMV e incluso relacionaron positivamente el grado de lesiones pulmonares con la expresión de “factor estimulante de la colonia granulocito-monocito” (GM-CSF).

1.4.2. Respuesta Inmune

La infección por el VMV induce en el organismo tanto una respuesta inmune celular como humoral, aunque como ya hemos mencionado, poco efectiva frente al virus, manteniéndose la infección durante toda la vida del animal (Cutlip *et al.*, 1988).

Otros autores, sin embargo, defienden que la persistencia del virus en el hospedador se debe a su capacidad de variar antigénicamente y evadir de este modo la respuesta inmune (Narayan *et al.*, 1977; Clements *et al.*, 1988; Cheevers *et al.*, 1999). Narayan *et al.* (1981) observaron que la variación antigénica del virus dependía del tipo de anticuerpo (AC) neutralizante al que se enfrentara, siendo mayor en aquellos virus enfrentados a ACs más tardíos, es decir, con un rango de neutralización mayor. Por el contrario, otros autores opinan que las variaciones antigénicas son raras en infecciones prolongadas por VMV *in vivo* (Thormar *et al.*, 1983), y que éstas no reemplazan al virus parental (Lutley *et al.*, 1983). Otra teoría para explicar la persistencia del virus es que su afinidad por los macrófagos es muy superior a la afinidad de los ACs por el VMV; además, los ACs neutralizantes son incapaces de prevenir la propagación del virus entre macrófagos (Kennedy-Stoskopf y Narayan, 1986).

1.4.2.1. Inmunidad Humoral

La infección por VMV induce la síntesis de ACs específicos fijadores del complemento y neutralizantes. En infecciones experimentales se ha apreciado que los ACs fijadores de complemento son los primeros en detectarse, entre una semana y tres meses después de la inoculación del virus, mientras que los ACs neutralizantes no se detectan hasta el primer-quinto mes post-inoculación (De Boer, 1970; Brahic y Haase, 1981; Sihvonen, 1981). La mayoría de los ACs neutralizantes se dirigen hacia la glucoproteína de superficie, aparecen de forma tardía y son de baja afinidad, por lo que se considera que no juegan un importante papel protector frente a la infección (Kennedy-Stoskopf y Narayan, 1986). Se desconoce el motivo por el cual la neutralización del VMV resulta ineficiente (Bertoni *et al.*, 1994; Pancino *et al.*, 1994), aunque se estudian como posibles responsables el tropismo hacia la célula hospedadora, las regiones inmunodominantes en el gen *env*, que pueden actuar como señuelo disminuyendo una posible respuesta protectora por parte de los ACs, y la interacción lentivirus-célula hospedadora (Garrity *et al.*, 1997).

En infecciones naturales por VMV se estimula la producción de ACs neutralizantes de tipo inmunoglobulina G1 (IgG1), sin producirse respuesta frente a la subclase IgG2, lo que podría favorecer de forma indirecta la persistencia del virus en el

organismo, ya que los IgG2 se caracterizan por su capacidad de opsonización y activan la fagocitosis de las partículas virales (Bird *et al.*, 1995). Estudios más recientes, han demostrado que la inmunidad humoral es eficaz para limitar la extensión del virus, detectándose ACs neutralizantes en el fluido cerebroespinal coincidiendo con la desaparición de virus libre de éste a los 3-4 meses postinfección (Andrésdóttir *et al.*, 2002). En un estudio longitudinal de infección en corderos empleando la técnica de inmunotransferencia se observó que la respuesta inmune humoral tiene lugar preferentemente frente a las proteínas p25, gp105, p16 y p14 (Kajikawa *et al.*, 1990). Por otro lado, Juste *et al.* (1998) realizaron un estudio en corderos durante los primeros 4 meses de vida y concluyeron que la producción de ACs anti-p25 fue máxima a las 5 semanas post-infección disminuyendo luego progresivamente, mientras que la producción de ACs anti-transmembrana aumentó de forma progresiva a lo largo de todo el estudio. En este mismo estudio se detectó la presencia de ACs neutralizantes a las ocho semanas post-infección.

1.4.2.2. **Inmunidad Celular**

Al contrario que lo observado en el caso de la respuesta inmune humoral, la respuesta inmune celular sí parece contribuir a la eliminación de el VMV, aunque cabe destacar que es poco constante (Larsen *et al.*, 1982) y poco útil para fines diagnósticos (Juste *et al.*, 2001).

La respuesta inmune celular se produce cuando los LT reconocen antígenos (Ag) presentes en otro tipo de células. Este reconocimiento es posible gracias al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), un conjunto de genes capaces de codificar moléculas de clase I y II que reaccionan con Ag intra y extracelulares respectivamente. La respuesta inmune celular es básica para eliminar infecciones víricas, activar macrófagos y regular las respuestas humorales (Tizard, 2009). Todas las células nucleadas pueden expresar moléculas CMH tipo I al reconocer Ag en su citosol, por lo que son capaces de presentar Ag a los LT CD8+ (o LT citotóxicos). Los LT CD8+ diferenciados reconocen a los antígenos asociados a las moléculas CMH tipo I, eliminando así las células infectadas (Tizard, 2009). Las CMH tipo II se encuentran en las células presentadoras de Ag (CPA) tales como las células dendríticas, fagocitos

mononucleares o linfocitos B (LB). Como respuesta al reconocimiento de los complejos Ag-CMH, los LT CD4⁺ generan estímulos para la proliferación y diferenciación de LT CD8⁺ y LB (Tizard, 2009).

En cabras se ha comprobado que los mecanismos de resistencia genética frente al AEC clínico, están relacionados con los Ag CMH I y II (Ruff *et al.*, 1993) desconociéndose el papel que representan en el caso del VMV.

Dependiendo de la vía de inoculación, la respuesta inmune celular frente al VMV puede tardar en aparecer entre una y cuatro semanas post-infección. Durante las cuatro a doce semanas posteriores, los niveles de células del sistema inmunitario descenderán hasta alcanzar valores normales (Griffin *et al.*, 1978; Sihvonen, 1981; Larsen *et al.*, 1982). Algunos autores han observado que en infecciones prolongadas la respuesta inmune celular tardía es transitoria, con picos en diferentes momentos tras la infección (Larsen *et al.*, 1982; Sihvonen, 1984). Reyburn *et al.* (1992b) emplearon cultivos de leucocitos de sangre periférica de oveja marcados con timidina tritiada para estimar la proliferación de células T mediante un contador de centelleo y caracterizar la respuesta inmune celular generada por el VMV; de este modo determinaron que en ovejas infectadas persistentemente con VMV la respuesta inmune celular tanto frente al virus completo como frente a la proteína p25, estaba mediada por LT CD4⁺ y CD8⁺ (Reyburn *et al.*, 1992b). La característica principal en infecciones por VMV es la inversión del ratio CD4⁺/CD8⁺ en los órganos diana (Watt *et al.*, 1992; Begara *et al.*, 1995), provocado por un aumento en el porcentaje de LT CD8⁺, que parecen tener importancia en el control de la carga viral mediante la eliminación de las células infectadas por el virus y también mediante la secreción de citoquinas inhibitoras. Este aumento de LT CD8⁺ provoca una de las lesiones características del MV, la linfoproliferación en los órganos diana. El desarrollo de esta línea celular se debe a una mayor presentación de antígeno al aumentar las células infectadas por VMV, produciéndose un incremento de la expresión de moléculas CMH, sobre todo de clase II.

El incremento de LT CD8⁺ es la única alteración fenotípica que se relaciona significativa y directamente con la intensidad de lesión pulmonar, pues es el

responsable de la actividad citotóxica frente a células portadoras de antígenos virales, es decir, frente a los macrófagos pulmonares (Luján *et al.*, 1995). En el caso del síndrome mamítico, los LT CD4+ se concentran en grandes grupos mientras los LT CD8+ se concentran alrededor de la barrera epitelial, donde se replica el virus masivamente, dañando los acinis e impidiendo la producción láctea. En el encéfalo, la mayoría de los LT son de tipo CD8+ y hay un aumento de CMH de clase II. En la membrana sinovial y líquido articular, contrariamente a lo que ocurre en el encéfalo, hay un predominio de LT CD4+.

La infección por lentivirus de los pequeños rumiantes provoca además una alteración en la expresión de las interleuquinas (ILs) en macrófagos (Zink y Johnson, 1994; Lechner *et al.*, 1997a) y de otros factores como el IFN-LV.

Las ILs estimulan el crecimiento y la diferenciación de linfocitos y activan a las células efectoras durante la inmunidad adaptativa. En la infección causada por el VMV, los macrófagos alveolares secretan en mayor grado la IL-8 mientras que en los ganglios linfáticos la IL-2 (o factor de crecimiento de células T) se produce en menor cantidad (Ellis y DeMartini, 1985b; Carey y Dalziel, 1993), disminuyendo consecuentemente la expresión de receptores para IL-2 en LT CD8+ (Bird *et al.*, 1993).

El aumento de IL-8 provoca la atracción al foco de infección de linfocitos y neutrófilos, generando la alveolitis característica del MV (Legastelois *et al.*, 1997). Los macrófagos alveolares en cuyo interior se replica VMV a altas velocidades incrementan la expresión del ARNm de IL-8; así a mayor cantidad de IL-8 producida, mayor será la lesión en pulmones (Legastelois *et al.*, 1996).

Las IL-2 actúan de forma autocrina, pues son sintetizadas por los LT CD4+ estimulados por Ag y actúan sobre sí mismos como factor de crecimiento. Los niveles de IL-2 disminuyen en animales sintomáticos, lo que sugiere un descenso de la defensa inmune frente a VMV en dichos animales (Carey y Daziel, 1993; Begara *et al.*, 1995).

Se conoce que los LT que interactúan con macrófagos infectados, inducen la producción de interferón (IFN-LV), el cual provoca un retraso en la maduración de los monocitos infectados a macrófagos (Kennedy *et al.*, 1985; Narayan y Cork, 1985). Por

otra parte, tiene un efecto quimiotáctico para los linfocitos, aumentando la expresión de moléculas de clase II en los macrófagos, que sintetizaran proteínas Jon y Fos, capaces de aumentar la transcripción de ARN vírico. El aumento de este IFN-LV y de los linfocitos que lo producen, puede estar relacionado con las lesiones a las que da lugar el VMV, caracterizadas por la presencia de linfocitos en las células diana (Narayan *et al.*, 1993).

1.5. CUADRO CLÍNICO

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son consecuencia del infiltrado y proliferación de células inflamatorias mononucleares que se produce en los órganos diana, siendo la alteración microscópica común en los órganos afectados. Generalmente, el VMV puede presentar cuatro manifestaciones principales, que en orden decreciente de frecuencia de presentación son: pulmonar (Maedi), mamario, nervioso (Visna) y articular, aunque cabe señalar que la frecuencia de las formas clínicas puede variar según la zona geográfica, el tropismo de la cepa vírica, la raza del animal, la carga genética individual, la edad y la ruta inicial de exposición (Luján *et al.*, 2001a). En cualquier caso el sistema hemolinfático, y en particular los ganglios linfáticos regionales, se ven afectados por la infección. Por lo general un mismo animal no presenta varias formas clínicas, y la enfermedad se localiza normalmente en un solo órgano (Luján *et al.*, 2001a).

1.5.1. Forma Pulmonar (Maedi)

La forma pulmonar es la manifestación más típica, apareciendo de forma lenta, progresiva y no evidente, y generalmente en animales de más de 2 años de edad (Luján *et al.*, 2001a). El primer signo clínico que presenta el animal afectado es la disnea, que se ve favorecida por factores estresantes externos como el esfuerzo físico, la climatología adversa, la gestación, el parto y/o la lactación (González, 1989a; Sigurdsson *et al.*, 1952). En un principio, la disnea aparece tras la realización de un esfuerzo físico, pero en estados avanzados de la enfermedad se hace evidente incluso en reposo (Luján *et al.*, 2001a). El animal también presenta un aumento significativo

del número de respiraciones por minuto (rpm), de 30-40 rpm a 80-120 rpm, pudiendo aparecer tos seca (Luján *et al.*, 1991). Aún en los casos más graves destaca la ausencia de tos productiva y flujo nasal, que solo aparecen cuando hay infecciones bacterianas secundarias (Luján *et al.*, 2001a). El apetito y la temperatura corporal no se ven afectados, pero los animales en fase clínica adelgazan progresivamente hasta llegar a un estado caquético (Sigurdsson *et al.*, 1952). En el animal vivo, la neumonía intersticial en el inicio de la infección por el VMV, antes de la aparición de los primeros síntomas, puede observarse mediante tomografía de alta resolución, apreciándose un engrosamiento de los tabiques interalveolares y áreas peribronquiolares, así como un aumento de la densidad del parénquima pulmonar (Cadoré *et al.*, 1997). Una vez que aparecen los síntomas, la muerte es inevitable, pudiendo ocurrir entre los 6 meses y 1 año después de la aparición de los mismos (Cutlip *et al.*, 1988).

Al abrir el tórax de un animal afectado, los pulmones no se colapsan y aparecen aumentados de tamaño, ocupando en ocasiones toda la cavidad torácica. Presentan forma acampanada, consistencia gomosa y un peso dos a tres veces mayor de lo normal (hasta 1200-1500 g). Poseen un color amarillo grisáceo y un punteado grisáceo característico de 1-2 mm de diámetro que puede profundizar en el parénquima y que corresponde con folículos linfoides observables microscópicamente. La superficie de corte del pulmón es seca y no se observa fluido en los bronquios. En estados avanzados de la enfermedad pueden aparecer impresiones costales en el pulmón y áreas de consolidación roja o gris como consecuencia de aparición de fibras colágenas y fibrocitos en número variable (González *et al.*, 1984; Campbell y Robinson, 1998). Los ganglios linfáticos mediastínicos y traqueobronquiales también se encuentran aumentados de tamaño, con un peso 3-5 veces superior al normal, llegando a alcanzar entre 6-10 g. El color es blanquecino y al corte presentan un aspecto húmedo y bastante homogéneo, de modo que no siempre se puede diferenciar la zona medular y la cortical (Ellis y DeMartini, 1985a).

Histológicamente las lesiones se corresponden con una neumonía intersticial crónica (Narayan y Cork, 1985; Mornex *et al.*, 1994). El aspecto histológico de los pulmones varía mucho según se trate de áreas consolidadas o no.

Así en las áreas no consolidadas del pulmón podemos observar dos tipos de lesiones (Georgsson, 1990):

- Engrosamiento de los tabiques interalveolares (debido a la infiltración de linfocitos y macrófagos sobre todo y en menor medida de células plasmáticas) e hiperplasia de fibras musculares. En principio esta lesión aparece en los bronquiolos terminales y conductos alveolares para avanzar posteriormente hacia los septos interalveolares.
- Hiperplasia linfoide difusa en zonas perivasculares o peribronquiales o bien diseminada por el parénquima a modo de agregados de linfocitos semejantes a folículos linfoides, frecuentemente con centros germinales activos en los que se observa mitosis.

En las áreas consolidadas del pulmón se observa una atelectasia alveolar total, debido al enorme engrosamiento de los tabiques interalveolares junto a la descamación de células alveolares a la luz (González *et al.*, 1984). La hiperplasia linfoide en estas áreas es mucho más manifiesta que en las áreas no consolidadas, observándose además una hiperplasia del epitelio de bronquiolos terminales y alveolos (Cutlip *et al.*, 1979). Gran cantidad de linfocitos se encuentran diseminados por el parénquima, y se concentran preferentemente en torno a bronquios y bronquiolos.

En los ganglios mediastínicos y traqueobronquiales se observa una marcada expansión de la corteza en la que aparecen numerosos folículos linfoides en varios estadios de actividad (Ellis y DeMartini, 1985a).

1.5.2. Forma Mamaria

La forma mamaria suele aparecer en animales de 3-5 años de edad, manifestándose sobre todo en los momentos que rodean al parto, aunque también se han notificado casos en animales más jóvenes (Van Der Molen *et al.*, 1985; Luján *et al.*, 2001a). Los animales afectados presentan mamitis indurativa crónica de carácter

difuso, bilateral y no dolorosa, con tumefacción de los nódulos linfáticos retromamarios (Smith, 1992).

Sin embargo, los signos son poco específicos y las modificaciones en la morfología mamaria no son muy evidentes, pasando desapercibidas para el ganadero (Luján *et al.*, 1991; Smith, 1992). En rebaños que crían los corderos con sus madres, la sospecha de MV se produce cuando se observan corderos que presentan retraso en el crecimiento o que incluso mueren por inanición como consecuencia de la mamitis que sufren las madres tras el parto (Anderson *et al.*, 1985; Van Der Molen *et al.*, 1985; Dawson, 1987).

En cuanto a las lesiones, en ocasiones puede observarse macroscópicamente una induración difusa en ambas mamas (Anderson *et al.*, 1985; Van Der Molen *et al.*, 1985). Al corte desaparece la textura granular típica del tejido mamario, para convertirse en una superficie homogénea y lisa. Además, los ganglios mamarios se encuentran aumentados de tamaño (Van Der Molen *et al.*, 1985).

La lesión histológica más característica es la proliferación linfoide con formación de nódulos linfáticos, que en ocasiones contienen centros germinales (Cross *et al.*, 1975; Oliver *et al.*, 1981a; Anderson *et al.*, 1985; Cutlip *et al.*, 1985b; Van Der Molen *et al.*, 1985). Estos nódulos pueden encontrarse periductalmente, incluso formando protrusiones hacia el interior de la luz de los conductos, comprimiéndolos, pero también pueden situarse en los lóbulos mamarios. Al lado de los nódulos linfáticos aparece una infiltración difusa de linfocitos con algunos linfoblastos activados, además de algunas células plasmáticas (Deng *et al.*, 1986). El epitelio ductal puede estar hiperplásico, pero frecuentemente presenta signos de degeneración, llegando a necrosarse, desprendiéndose hacia la luz del conducto. En glándulas en lactación, aparece una infiltración difusa de los lóbulos con destrucción de los acinis, que pueden contener restos de secreción láctea, además de existir un grado variable de fibrosis (Anderson *et al.*, 1985; Van Der Molen *et al.*, 1985).

1.5.3. Forma Nerviosa (Visna)

Los síntomas nerviosos aparecen generalmente en animales mayores de dos años de edad (Brahic y Haase, 1981). Sin embargo, existen casos en los que se ha diagnosticado en edades tempranas, incluso en animales de 4 meses de edad, en los que se ha relacionado con determinadas cepas víricas (Benavides *et al.*, 2006a, 2006b, 2007). Presenta dos manifestaciones clínicas, la más característica es la “medular” asociada a lesiones de la médula espinal que provocan parálisis progresiva del tercio posterior, de modo que los animales arrastran las extremidades posteriores y acaban postrados (Benavides *et al.*, 2006b). La forma “cerebral” se produce por afección del tronco del encéfalo (Christodouloupoulos, 2006) y se manifiesta clínicamente con ataxia, movimientos circulares e inclinación de la cabeza, temblor de músculos de la cara e incluso ceguera (Pétursson *et al.*, 1990; Watt *et al.*, 1992). Cabe destacar que el animal no pierde el apetito, pero va adelgazando progresivamente, incluso hasta alcanzar un estado caquético. La duración de los síntomas es de 6 meses a un año, e invariablemente termina con la muerte del animal (Dawson, 1980).

Las lesiones macroscópicas son poco frecuentes en los casos de Visna y en caso de producirse se limitan al sistema nervioso central. En casos avanzados de la enfermedad es posible observar una atrofia muscular del tercio posterior, uni o bilateral, unida a un estado de emaciación generalizado en el animal (Dawson, 1980).

Microscópicamente encontramos una leucoencefalomielitis crónica con desmielinización, llegando a la destrucción de la sustancia blanca en el cerebro, cerebelo y médula espinal (Sigurdsson *et al.*, 1957). Las lesiones se localizan predominantemente en las áreas periventriculares, plexos coroideos y leptomeninges (Georgsson *et al.*, 1976; Cutlip *et al.*, 1979). Raramente se observa destrucción neuronal (Sigurdsson y Pálsson, 1958). La infección de oligodendrocitos y astrocitos por el VMV también se ha confirmado *in vivo* (Stowring *et al.*, 1985).

1.5.4. Forma Articular

La forma articular suele aparecer dos o tres años después de la infección, cuando se evidencia inflamación en las articulaciones carpales y tarsales, cojera,

marcha envarada y caquexia, a pesar de no existir pérdida de apetito (Cutlip *et al.*, 1985b; Narayan y Cork, 1985). Se genera una artritis no supurativa, acompañada por edema periarticular (Cutlip *et al.*, 1985b). Se debe realizar un diagnóstico etiológico bacteriano o diferencial mediante histopatología antes de pensar en VMV como causa de la artritis, ya que la forma articular es poco corriente en ovejas de forma natural (Luján *et al.*, 2001a). Radiológicamente se observa mineralización de los tendones y de la cápsula articular, consistente en concreciones de 1-5mm dentro de la cápsula (Oliver *et al.*, 1981a).

Las articulaciones afectadas presentan mayor cantidad de fluido sinovial, que puede aparecer viscoso y turbio. Puede observarse también fibrina pero no pus. Existe un engrosamiento de la cápsula articular y del tejido periarticular por la formación de tejido conectivo fibroso, y se observan protuberancias vellosas de la línea sinovial, que además está hiperémica (Luján *et al.*, 2001a). El cartílago articular presenta áreas de necrosis y erosión, encontrándose restos en la cavidad articular (Oliver *et al.*, 1981a; Cutlip *et al.*, 1985b).

Microscópicamente, las lesiones más destacables son la proliferación de la membrana sinovial y la infiltración subsinovial de linfocitos y células plasmáticas, formando centros germinales. Se observa la aparición de pannus y cuando la lesión está avanzada, se llega a observar necrosis del cartílago y el hueso subyacente (Narayan y Cork, 1985).

1.6. DIAGNÓSTICO

La infección por VMV se puede diagnosticar por el análisis de los signos clínicos, el estudio anatomopatológico e histopatológico, el análisis inmunológico, el aislamiento vírico y mediante PCR (Juste *et al.*, 2001). Cada uno de estos métodos tiene sus ventajas e inconvenientes, por lo que debe valorarse cuál es el método más adecuado a utilizar según la circunstancia en la que nos encontremos.

Aunque en la actualidad no hay ninguna prueba universalmente aceptada como “gold standard” para determinar la sensibilidad (Se) y la especificidad (Sp) de los test

usados en el diagnóstico de la infección por LVPR, el éxito de los programas de control indica que los test serológicos utilizados actualmente son útiles para reducir la prevalencia de la infección. Hay varias técnicas serológicas comercializadas, la mayoría son el IDGA y el ELISA, consideradas validadas para el comercio internacional por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2008).

1.6.1. Diagnóstico Clínico y Anatomopatológico

La primera fase del diagnóstico del VMV es el análisis de los signos clínicos y su patrón de presentación en un rebaño. No se trata de signos clínicos patognomónicos de la enfermedad aunque su aparición, evolución y mantenimiento en el rebaño podrían orientar el diagnóstico. Estos datos son de gran importancia informativa a la hora de realizar la necropsia en el animal y a la hora de tomar muestras para el examen histopatológico. Sin embargo es conveniente resaltar que, debido al largo periodo de incubación del virus, la identificación de los síntomas solamente servirá para detectar la enfermedad en las explotaciones con altas prevalencias y, dado la baja relación entre animales infectados y animales con síntomas, no tiene mucho valor en el diagnóstico en los animales individuales.

La presentación respiratoria de la enfermedad (la más frecuente), resulta relativamente fácil de detectar al realizar la necropsia de los animales enfermos: pulmón de consistencia gomosa y con aumento de volumen y peso, que junto con la caquexia y el historial del animal y del rebaño, permiten proponer un diagnóstico de Maedi con un alto grado de seguridad. No ocurre lo mismo con las otras formas de presentación que, o bien no provocan lesiones macroscópicas (forma nerviosa), o son poco específicas (forma mamaria). El examen de preparaciones histológicas de los órganos afectados, en todo caso, permite realizar una confirmación definitiva de MV (González, 1989a).

1.6.2. Diagnóstico Laboratorial Indirecto

Teniendo en cuenta las características descritas del VMV y la naturaleza lenta de la enfermedad, las técnicas indirectas son la herramienta más importante y la más utilizada para el diagnóstico y control del MV. La respuesta humoral generada, incluso 2-3 semanas post-infección, y que se mantiene a lo largo de la vida del animal, resulta muy útil para poder llegar a un diagnóstico definitivo. El VMV induce la producción de altos títulos de ACs séricos específicos no protectores frente a la cápsula proteica y el núcleo viral, por lo que se han desarrollado distintas pruebas serológicas basadas en la detección de estos ACs, como la seroneutralización (Sigurdardóttir y Thormar, 1964), la fijación del complemento (FC) (Gudnadottir y Kristinsdottir, 1967), la hemoaglutinación pasiva (Karl y Thormar, 1971), la inmunofluorescencia indirecta (De Boer, 1970), la radioinmunoprecipitación (RIPA) (Gogolewski *et al.*, 1985), el radioinmunoensayo (RIA) (Torfason *et al.*, 1992), el Western blotting o inmunoblot (WB) (Houwers y Nauta, 1989), la inmunodifusión en gel de agarosa (IDGA) (Winward *et al.*, 1979) y el ELISA (Houwers *et al.*, 1982). De entre estas técnicas, los métodos de diagnóstico serológico más utilizados actualmente son la IDGA y el ELISA porque permiten realizar gran número de muestras de forma rápida y barata. No obstante, la técnica de WB se ha utilizado como técnica confirmatoria para resultados dudosos a ELISA e IDGA (Saman *et al.*, 1999; Ozyoruk *et al.*, 2001; Varea *et al.*, 2001). Asimismo, la técnica RIPA (Gogolewski *et al.*, 1985) y la RIA, se han utilizado para realizar la puesta a punto de los ELISAs (Vander *et al.*, 1994).

La **IDGA** ha sido quizás la técnica serológica más usada en el diagnóstico de LVPR hasta la aparición de los ELISAs de nueva generación. Aun cuando la mayoría de estudios indican que la sensibilidad (Se) de los test de ELISA actuales supera a los test de IDGA, ambas técnicas se describen en el código sanitario para los animales terrestres de la OIE como pruebas diagnósticas de referencia (Houwers y Nauta, 1989; Zanoni *et al.*, 1991; Kwang *et al.*, 1993). Esta técnica fue descrita por primera vez por Cutlip *et al.* (1977), siendo mejorada por Winward *et al.* en 1979, y se basa en la detección de ACs frente a antígenos solubles de la proteína de superficie gp135 y de la cápside p25. Los sueros que contienen dichos ACs específicos generan dos bandas de precipitado correspondientes a cada una de las proteínas (Cutlip *et al.*, 1977). La

ventaja de la IDGA es su alta especificidad (Sp), próxima al 100%, aunque su Se fue estimada en un 80,9% por Winward *et al.* (1979). Otro inconveniente de esta técnica es que la interpretación de los resultados puede resultar un tanto subjetiva, dependiendo de la experiencia del observador, pudiendo arrojar diferentes resultados según la persona que realice la lectura (Juste *et al.*, 2001).

Hoy en día se considera el **ELISA** como el test serológico más sensible y gracias a sus grandes posibilidades de automatización y su elevada reproducibilidad, es la técnica más usada en el diagnóstico del VMV para el análisis de gran volumen de muestras (De Andrés *et al.*, 2005), como es el caso de los programas de control.

Los más empleados son los ELISAs indirectos (ELISAI) que utilizan ACs marcados con una enzima que reaccionan con los ACs problema, de modo que al añadir el sustrato generan una reacción coloreada que se puede medir por espectrofotometría. Según el tipo de antígeno que utilizan se denominan ELISAs de virus completos (el antígeno sería la partícula vírica completa) o ELISAs recombinantes (el antígeno empleado es una proteína recombinante y/o péptidos sintéticos) (De Andrés *et al.*, 2005). También se han descrito ELISAs de competición (ELISAc) (Fevereiro *et al.*, 1999), siendo empleados con menor frecuencia.

Cabe destacar que a lo largo de su historia los ELISAs han evolucionado, catalogándose como ELISAs de primera, segunda o tercera generación en relación a las características de los conjugados y antígenos utilizados. Los ELISAs de primera generación utilizan preparaciones de virus procedentes de sobrenadantes de cultivos virales altamente purificados y como conjugado sueros policlonales (Houwers y Gielkens, 1979; Houwers *et al.*, 1982; Vitu *et al.*, 1982; Zaroni *et al.*, 1994; Celer *et al.*, 1998). El principal problema era la aparición de falsos positivos al coexistir proteínas celulares copurificadas con las virales. Este problema podía resolverse diluyendo la muestra, pero al mismo tiempo disminuía la Se del test y aparecían falsos negativos (Pepin *et al.*, 1998).

La segunda generación de test de ELISA se basa en el empleo de ACs monoclonales como conjugado (Houwers y Schaake, 1987) y de antígenos de gran pureza obtenidos mediante técnicas de recombinación del ADN en cultivos bacterianos

de *Escherichia coli*, incluidos la p25, la proteína transmembrana (TM), la glicoproteína gp 46 y la glicoproteína externa de envoltura (Zanoni *et al.*, 1991; Kwang y Cutlip, 1992; Reyburn *et al.*, 1992a; Kwang *et al.*, 1993; Keen *et al.*, 1995; Power *et al.*, 1995). Estos ELISAs son generalmente más sensibles y específicos que los que utilizan virus enteros (Pepin *et al.*, 1998).

Finalmente, los ELISAs de tercera generación se basan en el uso de oligopéptidos sintéticos con mayor pureza estructural. Estos oligopéptidos de la envuelta viral forman parte de epítomos inmunodominantes TM (gp 40) (Kwang y Torres, 1994). Estos métodos mejoran considerablemente la Sp, sin embargo su Se puede verse reducida y para evitar esta limitación frecuentemente se incluyen además proteínas recombinantes del núcleo viral.

Debemos resaltar que la técnica ELISA, como se ha comentado anteriormente, es más sensible que la IDGA y se estima que es capaz de detectar entre 7-12% de animales infectados y negativos a esta técnica (Houwers *et al.*, 1982; Vitu *et al.*, 1982; Simard y Briscoe, 1990; Celer *et al.*, 1998). Sin embargo, al estudiar la eficacia diagnóstica de los diferentes test comerciales disponibles para el VMV, se ha demostrado una escasa Se en las primeras fases de la infección frente a diferentes genotipos del virus (Lacerenza *et al.*, 2006). Se ha sugerido que la gran heterogeneidad de los epítomos inmunodominantes del antígeno de la cápside que se utilizan en los test serológicos podría afectar a la Se de los mismos (Grego *et al.*, 2002), por lo que podría ser muy útil para los programas de control y erradicación de la enfermedad el desarrollo de ELISAs con antígenos específicos de la cepa predominante en una determinada zona o región (Grego *et al.*, 2002, 2009; Reina *et al.*, 2009).

La técnica de **Western blotting** (WB) se ha utilizado para analizar las respuestas de los ACs hacia las proteínas virales gp135 (SU), gp44 (TM), p25 (CA), p17 (MA) y p14 (NC) en suero de ovejas y cabras infectadas experimentalmente o de forma natural, observándose que se pueden obtener resultados falsos positivos. La técnica de Western blotting es, según algunos autores, tan sensible o más que los ELISAs recombinantes (Houwers y Nauta, 1989; Brodie *et al.*, 1992), siendo su empleo más útil como test confirmatorio que como test de screening en grandes colectividades.

1.6.3. Diagnóstico Laboratorial Directo

En cuanto a los métodos basados en la detección del virus se pueden clasificar según el material que detecten. Así tenemos métodos basados en la detección de la partícula viral completa, como en el caso del aislamiento vírico y microscopía electrónica; métodos basados en la detección de su material genético, como en el caso de la hibridación *in situ* y el PCR; o métodos basados en la detección de sus proteínas estructurales, como la inmunohistoquímica.

El **aislamiento vírico** es el diagnóstico etiológico tradicional que se basa en el cultivo de células permisivas a la infección por el VMV con explantes de tejido de los animales a analizar, que podrán o no estar infectados. En caso de que exista infección, las células sufren el efecto citopático tras 2-3 semanas de incubación (Sihvonen *et al.*, 1980a; Sihvonen, 1984), que consiste en la formación de células gigantes multinucleadas (sincitios); en algunos casos puede no observarse, bien porque la cepa viral no induce un claro efecto citopático o porque el virus permanece latente (Chebloune *et al.*, 1996). Como ya hemos mencionado, la naturaleza vírica del MV fue descubierta mediante el aislamiento del agente causal a partir de tejido nervioso (Sigurdsson *et al.*, 1960) y de tejido pulmonar (Sigurdardóttir y Thormar, 1964). Desde entonces se ha logrado aislar el VMV del pulmón (Sigurdardóttir y Thormar, 1964; Gudnadottir *et al.*, 1968; Oliver *et al.*, 1981a), ganglios mediastínicos, bazo, plexo coroideo (Gudnadottir *et al.*, 1968; Oliver *et al.*, 1981a), mama (Cutlip *et al.*, 1985a) y membrana sinovial (Oliver *et al.*, 1981a; Cutlip *et al.*, 1985b). También se ha aislado de los siguientes fluídos: sangre (De Boer, 1975; Narayan *et al.*, 1977), secreciones bronco-alveolares (Brodie *et al.*, 1998), líquido cefalorraquídeo (Gudnadottir *et al.*, 1968), líquido sinovial (Brodie *et al.*, 1995), leche (Ouzrout y Lerondelle, 1990) y semen (De la Concha-Bermejillo *et al.*, 1996) y ocasionalmente a partir de saliva y secreciones nasales (Gudnadottir y Pálsson, 1965). Aun así, las líneas celulares empleadas más frecuentemente para el cultivo vírico son los fibroblastos del plexo coroideo de corderos o fetos ovinos (Sigurdardóttir y Thormar, 1964; Sihvonen y Veijalainen, 1981), explantes de pulmón ovino (Kennedy *et al.*, 1968; Cutlip y Laird, 1976), membrana sinovial de cabra (Juste *et al.*, 2000) y células corneales ovinas (Cutlip *et al.*, 1985b; Brodie *et al.*, 1992). Aunque el aislamiento del virus proporciona un diagnóstico

definitivo, se trata de un procedimiento caro y laborioso que necesita un largo periodo de tiempo para su realización (Knowles, 1997).

La **inmunohistoquímica** se basa en la detección de un antígeno en diferentes tejidos gracias a la unión de ACs específicos marcados, visualizándose por medio de una reacción química colorimétrica (Lawrence, 1990). Para marcar el AC se utiliza la fluoresceína o enzimas como la peroxidasa. La inmunohistoquímica permite localizar con precisión los lugares donde se produce la replicación vírica, siendo por lo tanto una técnica muy útil en la identificación de las distintas poblaciones celulares asociadas en la infección por el VMV, y ha facilitado el estudio de la patogenia de la enfermedad. Los primeros estudios inmunohistoquímicos en MV se combinaban con la hibridación *in situ*, de manera que se podía identificar el tipo celular infectado mediante inmunohistoquímica y detectar el ARN viral mediante hibridación. Gendelman *et al.* (1985) demostraron la presencia de ARN viral en precursores de monocitos/macrófagos en médula ósea. Trabajos posteriores han detectado el antígeno vírico en otras células diferentes a las de la línea monocito-macrófago como son las células epiteliales de la glándula mamaria (Bolea *et al.*, 2006). A pesar de estos avances aportados por la inmunohistoquímica en el conocimiento de la infección por VMV, se trata de una técnica muy cara y laboriosa, pudiendo presentar también reacciones inespecíficas, especialmente cuando se utilizan ACs policlonales. Por todo ello, su empleo se restringe sobre todo a estudios experimentales y no se emplea en estudios epidemiológicos amplios (Álvarez, 2005).

En cuanto a la detección de los ácidos nucleicos víricos, las dos técnicas más empleadas son la hibridación *in situ*, y la PCR, empleándose a veces de forma conjunta.

La **hibridación *in situ*** se basa en la detección de ADN/ARN viral en cortes de tejidos o preparaciones celulares a partir de secuencias complementarias, denominadas sondas, marcadas con sustancias radiactivas o colorimétricas (Amorena *et al.*, 1997). Las técnicas colorimétricas, que usan digoxigenina o biotina, son las más usadas por ser de menor riesgo para el manipulador, más rápidas y presentar una buena Se y Sp. La hibridación *in situ* permite localizar el virus en las células y órganos diana y, en combinación con la inmunohistoquímica, ha permitido diferenciar células

infectadas en estado latente de las que soportan una infección productiva (Gendelman *et al.*, 1985). Asimismo Roy *et al.* (1992) consiguieron detectar ARN vírico y antígenos de VMV en la misma célula al emplear como fijador de los tejidos acetona en vez de formaldehído, lo que permitía la realización de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* combinadas, sin perder señal en la hibridación. Al igual que la técnica anteriormente descrita, su empleo se restringe a estudios experimentales debido a la laboriosidad y al alto coste de la misma.

La **PCR** es una técnica de biología molecular desarrollada en 1994 por Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular. Mediante esta técnica se ha detectado LVPR tanto libre como asociado a células, a partir de muestras de fluidos y de tejidos de animales infectados (Zanoni *et al.*, 1990; Johnson *et al.*, 1992; Extramiana *et al.*, 2002). Cabe destacar que para poder detectar el virus libre, es decir, no integrado en células, es necesario realizar un proceso de retrotranscripción del ARN, pasándose a denominar la técnica “PCR transcriptasa inversa (RT-PCR)” (Juste *et al.*, 2001). En general, existen dos inconvenientes a la hora de desarrollar una técnica de PCR con alta Se diagnóstica de la infección por VMV, la heterogeneidad genética entre cepas y la baja carga viral *in vivo*. La variabilidad en la secuencia de nucleótidos es debida fundamentalmente a la frecuencia de errores asociados a la RT que es del orden de una base por cada 10⁵ nucleótidos durante la replicación viral (Pasick, 1998). Por otro lado, se considera que sólo 1 de cada 10⁶ leucocitos portan el provirus en sangre (Haase, 1986).

La mayoría de los estudios de PCR han sido dirigidos a la detección de VMV en células mononucleares de sangre periférica, pero también se han probado en otro tipo de matrices como la leche, el calostro, el semen y el líquido sinovial. La utilidad principal que aporta la PCR es la detección de animales infectados por el VMV antes de la seroconversión, de modo que en comparación con las técnicas serológicas es más sensible durante el primer año de vida permitiendo detectar la infección en animales con ACs calostrales y en los que se encuentran en estado de latencia serológica o que se han infectado recientemente (Rimstad *et al.*, 1993; Wagter *et al.*, 1998; Celer *et al.*, 2000; Daltabuit-Test, 2005; Álvarez *et al.*, 2006; Gil *et al.*, 2006). Sin embargo, en muestras de sangre la PCR por lo general presenta menor Se que el ELISA debido a la

baja carga vírica (Brodie *et al.*, 1992) y a la variabilidad genética de las distintas cepas del virus. Recientemente se vio que la Se de una PCR frente a las regiones LTR de VMV en muestras de sangre, leche y tejidos comparada con los resultados de las técnicas ELISA e IDGA combinadas, fue de un 84%, 67% y 88% respectivamente, y conjuntamente de 98% y la Sp el 100% (Extramiana *et al.*, 2002). Esto sugiere que la pauta más efectiva para la detección de la infección es la combinación de la serología con la PCR (De Andres *et al.*, 2005; Gil *et al.*, 2006). En un estudio publicado recientemente (Brinkhof *et al.*, 2010), se describe la erradicación de la enfermedad en un rebaño que partía con una seroprevalencia inicial del 52% al emplear una combinación de ELISA (Saman *et al.*, 1999; Brinkhof y Van Maanen, 2007) y PCR a tiempo real (Brinkhof *et al.*, 2008) como técnica diagnóstica. En dos años consiguieron erradicar la enfermedad sacrificando a los animales positivos a las dos técnicas y realizando muestreos cada 3 meses.

1.7. PREVENCIÓN Y CONTROL

Hasta la fecha no existe ninguna vacuna comercial que prevenga la enfermedad del MV y el tratamiento disponible no es económicamente viable en las explotaciones de ovino. Esto hace que las únicas medidas que se pueden establecer sean aquellas encaminadas a prevenir y controlar la enfermedad, esto es, orientadas a evitar el contagio de animales no infectados, la eliminación de los infectados y la reposición exclusiva con animales sanos. Históricamente se han puesto en práctica estas pautas clásicas de control de forma simultánea o independiente y con éxito variable.

El primer paso a seguir en cualquier programa de control de la enfermedad es la **clasificación sanitaria** de la granja mediante estudio serológico. La prevalencia inicial del MV en el rebaño va a determinar en gran medida el tipo de estrategia a seguir. Cobran en este punto gran importancia los parámetros de rendimiento de la técnica empleada para el diagnóstico, influyendo en la eficacia de los programas de control. Actualmente se recomienda emplear como técnicas diagnósticas ELISAs de nueva generación junto al PCR como técnica de confirmación, realizándose análisis de todos los animales mayores de seis meses de edad y de forma anual (Reina *et al.*, 2009). Una

vez conocida la seroprevalencia del rebaño debemos clasificarlo en rebaño de alta, intermedia o baja seroprevalencia, o rebaño seronegativo. Posteriormente debe elegirse un programa de control específico, adaptado al sistema de cría y de gestión de la explotación y siempre en base a la seroprevalencia. Además, en todo programa de control se recomienda controlar tanto el VMV como el VAEC a fin de evitar la posible propagación viral entre ambas especies (Brülisauer *et al.*, 2005).

Un punto clave en la prevención y control de cualquier enfermedad es **evitar la entrada de animales infectados**. En caso de realizarse la compra de animales, éstos deberían proceder de rebaños libres de la enfermedad, incorporando de esta manera animales seronegativos al rebaño. El problema es que en determinadas regiones y sistemas productivos en España es difícil encontrar rebaños libres de la enfermedad. Cabe resaltar que esta opción debería servir para incentivar a los ganaderos a conseguir eliminar la enfermedad del rebaño para poder así luego obtener un valor añadido en la venta posterior de animales a otros rebaños. La compra anual de animales libres de la enfermedad aplicado como método único en un programa de control no se ha evaluado en campo, aunque teóricamente si la seroprevalencia inicial de la enfermedad es baja, la infección podría ir difuminándose a medida que se fueran añadiendo de forma anual nuevos animales no infectados (Houwers, 1990). El problema se encuentra en rebaños de alta-media seroprevalencia, ya que los animales incorporados se podrán infectar con relativa facilidad, con lo que en este tipo de explotaciones debería compaginarse con otras estrategias que veremos a continuación:

- a) Reemplazo total del rebaño infectado por ganado libre de la infección: fue una de las primeras estrategias empleadas en la erradicación de la enfermedad. Este método tan drástico fue el empleado en el brote epidémico de Islandia. Al no existir métodos de diagnóstico fiables, se llevó a cabo el sacrificio completo de todos los rebaños en el que hubiera algún animal enfermo, realizando un vacío sanitario y haciendo reposición con animales provenientes de áreas no afectadas. El método fue efectivo, ya que desde entonces la cabaña ovina islandesa está libre de VMV, sin embargo esta estrategia es poco viable en países como España, donde, como ya hemos mencionado, la infección está ampliamente diseminada

con elevadas prevalencias intra-rebaño (Luján *et al.*, 1993) siendo muy difícil conseguir suficientes animales para reposición (De Boer *et al.*, 1978) y provocando la pérdida de determinadas líneas de alto valor genético (Houwens, 1990).

- b) Análisis serológicos periódicos y sacrificio de animales seropositivos: se trata de una variante a la estrategia de sacrificio total, llevándose a cabo la eliminación solamente de los animales seropositivos, con o sin su progenie. Este método es de gran utilidad en aquellos rebaños con baja seroprevalencia, siendo necesaria la realización de controles serológicos periódicos. La eficacia de este método se ha comprobado tanto en estudios experimentales (De Boer y Houwers, 1979) como en estudios de campo (Houwens *et al.*, 1984; Cutlip y Lehmkuhl, 1986). Cutlip y Lehmkuhl (1986), eliminando periódicamente los animales seropositivos, lograron erradicar el VMV de un rebaño en 6-7 años. Cuando además se realizaba la eliminación de la progenie de las ovejas seropositivas, se aceleraba el proceso de erradicación (Houwens *et al.*, 1984). Del mismo modo, en rebaños donde el porcentaje de animales que seroconvierten al año es similar o menor al porcentaje de animales eliminados, se puede conseguir una disminución de la prevalencia con un desvieje selectivo de animales adultos seropositivos, sin aumentar el porcentaje de eliminación y haciendo recría con animales seronegativos (Berriatua *et al.*, 2003).
- c) Creación de un rebaño paralelo con animales no infectados separado del rebaño original infectado: se trata de otra estrategia de control nombrada en la literatura, recomendada en aquellos rebaños con elevada prevalencia de MV, dónde no es viable eliminar todos los animales infectados. Para ello debe abastecerse al rebaño libre de infección con corderas no infectadas, siendo necesario separarlas de la madre al nacimiento y criarlas artificialmente con calostro y leche libre de VMV (Houwens, 1990). Hay que resaltar que este método es muy laborioso para el ganadero, que debe gestionar dos rebaños separados durante al menos tres o cuatro años hasta la desaparición del rebaño infectado, e implica disponer de instalaciones para alojar el segundo rebaño. Sin embargo, tiene la ventaja de que posibilita el mantenimiento en la explotación de líneas genéticas interesantes y no

conlleva sacrificio inmediato de animales con buena producción en caso de estar infectados.

- d) Cría de los corderos con calostro artificial para reducir el contagio de la reposición: a través de esta pauta de manejo evitaríamos la infección de las corderas de reposición a través del calostro y la leche, siendo necesario separarlas de sus madres nada más nacer y administrarles calostro y leche libre de virus. En los rebaños mixtos, los corderos no deben alimentarse con calostro o leche de cabra, ya que podría actuar como fuente de transmisión de la enfermedad (Peterhans *et al.*, 2004). Aunque se ha descrito la efectividad de este método en la prevención de la infección en corderas y cabritas (Houwers *et al.*, 1983; Rowe *et al.*, 1992), el encalostramiento artificial supone un gran esfuerzo para el ganadero, difícil de implementar en explotaciones de ovino de carne, y es importante resaltar que esta estrategia de control puede servir de poco si no se complementa con la prevención de la transmisión horizontal, tal como se mencionó previamente (Berriatua *et al.*, 2003; Álvarez *et al.*, 2005).
- e) Recría a partir de hijas de seronegativas y desvieje de animales seropositivos: en rebaños donde la incidencia de infección es inferior o similar a la tasa de desvieje y reposición, es posible reducir la prevalencia progresivamente realizando el desvieje con animales seropositivos. La eficacia de esta estrategia mejora realizando la reposición a partir de corderas hijas de madres seronegativas, y preferentemente mayores de 3 años de edad (Berriatua *et al.*, 2003). Tanto Berriatua *et al.* (2003), como Leginagoikoa *et al.* (2010) sugieren que quizás de este modo se seleccionen líneas genéticas más resistentes a la infección, ya que corderos nacidos de madres seronegativas tienen menos probabilidad de seroconvertir a lo largo de su vida, más que por el hecho de evitar la transmisión lactógena. Ferrer (1996) empleó esta estrategia de control en rebaños extensivos y semiextensivos de Rasa Aragonesa, unido a la aplicación del desvieje selectivo de aquellos animales con signos clínicos de enfermedad (neumonía crónica o sin leche en ambas mamas) consiguiendo reducir considerablemente la prevalencia de la enfermedad en dichos rebaños.

- f) Selección genética de animales resistentes: algunos autores proponen la selección de ovejas naturalmente resistentes a los lentivirus ovinos (DeMartini *et al.*, 1991). Para ello es necesario la identificación de marcadores genéticos de resistencia al virus, y aunque se están obteniendo progresos en este ámbito sólo se han descubierto marcadores para otros lentivirus como el VAEC (Herrmann-Hoesing *et al.*, 2008; Larruskain *et al.*, 2010). Como hemos mencionado anteriormente, el hecho de que, en los rebaños infectados, la descendencia de ovejas seronegativas adultas de más de cuatro años presente menor riesgo de seroconversión sugiere la existencia de un componente heredable de resistencia y susceptibilidad a la infección que podría ser útil de cara al control de la enfermedad (Berriatua *et al.*, 2003; Álvarez, 2005).

En España no existen programas nacionales de control aunque si existen ejemplos a nivel regional y de asociaciones ganaderas. Cabe resaltar el caso de Aragón, donde han establecido un programa de erradicación del VMV basado en el desvieje de animales seropositivos y su reposición a partir de hijas de madres seronegativas sin aumentar necesariamente la tasa de desvieje y reposición del rebaño (Biescas, 2006). Dicho programa es aplicable en rebaños con seroprevalencias medias-bajas, siendo de difícil aplicación en explotaciones con seroprevalencias medias-elevadas donde los animales seronegativos son insuficientes para poder obtener la cría necesaria y de este modo realizar una mayor eliminación selectiva de animales seropositivos. Todo ello pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios de análisis de riesgos asociados a la enfermedad, que puedan vislumbrar nuevas estrategias de control en base a medidas de manejo que puedan ser aplicadas en granjas de ovino de carne.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El Maedi-Visna es una enfermedad de distribución mundial, descrita en todas las Comunidades Autónomas españolas donde se han realizado estudios al respecto (Leginagoikoa, 2010). A pesar de provocar notables pérdidas económicas en el sector ovino, en Galicia continúa siendo desconocida para la mayoría de los productores. Este hecho puede deberse a su presentación insidiosa y fundamentalmente subclínica, así como a la ausencia de un sistema de evaluación productiva de los animales en nuestra Comunidad y a la falta de estudios y programas de control sobre la enfermedad. Debido a la ausencia de vacunas y de un tratamiento eficaz, la única herramienta de la que se dispone para poder reducir los porcentajes de infección y mejorar por lo tanto la rentabilidad de las explotaciones, es la aplicación de programas de control adecuados y específicos, siendo para ello indispensable el conocimiento previo del estatus serológico de la cabaña ganadera frente a la infección. Estas premisas llevaron a la necesidad realizar un estudio sobre la prevalencia del MV en el ganado ovino de carne en explotaciones con una orientación comercial de Galicia.

Todo programa de control del MV debería basarse en la identificación y eliminación de animales infectados y en la prevención de nuevas infecciones (Houwers y Nauta, 1989). Sin embargo, muchas de las medidas para disminuir la prevalencia de la enfermedad, como la separación al nacimiento de los corderos y cría con lactación artificial (Reina *et al.*, 2009), son difíciles o incluso imposibles de establecer con las condiciones de manejo de los rebaños de ovino de carne. Se hace por lo tanto necesario desarrollar estrategias específicas para los diferentes sistemas de producción ovina (Leginagoikoa *et al.*, 2006a). Las grandes diferencias observadas en la prevalencia de VMV en rebaños con un mismo sistema productivo (Alba *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2010) sugieren la existencia de otros factores que favorecen la transmisión del virus e influyen en la prevalencia y que, por tanto, son susceptibles de ser tenidos en cuenta en los programas de control.

Las condiciones en las que se mantienen los animales en las explotaciones semiintensivas de ovino de carne de Galicia varían según el tipo de manejo y la edad de los ovinos. En el período comprendido entre el nacimiento y el destete es donde se observan las mayores diferencias de manejo de los animales entre las distintas explotaciones, y por ello es donde se pueden establecer modificaciones con mayor

facilidad. El estudio de posibles diferencias en la prevalencia de la enfermedad dependiendo del manejo de los animales en este período puede ayudar a determinar cuál es el más adecuado para controlar el MV.

En Galicia, como en otras regiones españolas, es frecuente la presencia de un pequeño número de cabras que conviven en un contacto más o menos estrecho con el rebaño de ovinos. A pesar de que la transmisión de lentivirus entre ganado ovino y caprino y viceversa es bien conocida (Peterhans *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2004b), no se ha determinado la importancia que este hecho puede tener sobre la prevalencia de la enfermedad en condiciones de campo.

Del mismo modo, todo programa de control ha de estar basado en información de los patrones epidemiológicos de la enfermedad, para lo cual sería ventajoso conocer también la incidencia de la misma en la población, ya que permitiría comprender el patrón de transmisión de la enfermedad y a identificar aquellos grupos con mayor riesgo. Sin embargo, estos estudios suelen ser mucho más costosos que los estudios transversales y difíciles de llevar a cabo con un gran número de animales. Esta problemática ocasionó que a lo largo de estos últimos años se hayan diseñado y propuesto distintos métodos estadísticos aplicados, en un principio, a estudios epidemiológicos del VIH, que permiten estimar de una manera precisa los valores de incidencia a partir de datos transversales en una determinada población.

Asimismo, se ha descrito que las parasitosis broncopulmonares podrían favorecer la infección por el VMV, y aunque no hay un consenso al respecto (Boer *et al.*, 1979; Giangaspero *et al.*, 1993; Mornex *et al.*, 1994), se afirma que la aplicación de tratamientos antihelmínticos profilácticos reducirían el riesgo de transmisión del VMV (Straub, 2004). En la Comunidad Autónoma gallega, a pesar de que se ha producido una disminución en la prevalencia individual de parásitos broncopulmonares en la última década, la prevalencia a nivel de rebaño continúa siendo elevada (67,6%; López *et al.*, 2011). Por lo tanto, dado el elevado nivel de prevalencia de este tipo de parasitaciones en ovejas de Galicia y su descripción en la bibliografía como un posible factor predisponente de la enfermedad del MV, cobra gran importancia el determinar

el papel de las mismas en la epidemiología de la enfermedad en los rebaños de ovino de carne gallegos.

Por tanto, el presente estudio al que hemos titulado “Maedi Visna en el ganado ovino de carne de Galicia: análisis de factores de riesgo como aproximación a su control”, nace ante la necesidad de conocer el estatus sanitario frente al MV del ganado ovino gallego con orientación comercial y los principales factores de riesgo asociados con la infección, que posteriormente pueden servir de base para establecer las medidas de control más adecuadas en este tipo de explotaciones.

Así, los objetivos perseguidos fueron los siguientes:

1. Determinar la seroprevalencia del Maedi Visna en las explotaciones de ovino de carne de Galicia con orientación comercial.
2. Analizar la relación entre la seroprevalencia y diferentes factores de riesgo de la enfermedad tanto a nivel de rebaño como a nivel individual.
3. Aplicación de herramientas estadísticas empleadas en el estudio epidemiológico del Virus de la Inmunodeficiencia Humana a la enfermedad del MV, con el objeto de estimar su incidencia a partir de estudios de prevalencia transversales.
4. Estudiar la relación entre la seropositividad al MV y las parasitaciones broncopulmonares, a fin de esclarecer la posible relación existente entre las dos enfermedades.
5. Valorar, según los resultados obtenidos, la necesidad de establecer un programa de control y erradicación de la enfermedad en las explotaciones semiintensivas de ovino de carne de Galicia.
6. Proponer las medidas que puedan tener utilidad a la hora de implantar un programa de control de la enfermedad en las condiciones de manejo del ganado ovino semiintensivo de carne teniendo en la seroprevalencia de la enfermedad en el rebaño.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. POBLACIÓN Y ZONA DE ESTUDIO

El ganado ovino ha sido históricamente el principal pilar de la ganadería española dadas las particularidades climatológicas, orográficas y edafológicas de nuestro país. Este hecho se refleja en el elevado número de cabezas de ovino en España, uno de los más relevantes dentro de la Unión Europea, y solo superado por el Reino Unido (Figura 7). Sin embargo, en Galicia, Comunidad Autónoma donde se ha llevado a cabo el presente estudio, el ganado ovino no posee la misma importancia que en otras regiones del país (Figura 7), representando en el año 2007 un 1,3% del total del censo nacional (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2007) y cuya tipología podemos observar en la Tabla 5. En el año 2007, el censo ovino alcanzó las 236.224 cabezas distribuidas en un total de 22.433 rebaños (Consellería de Medio Rural, 2007).

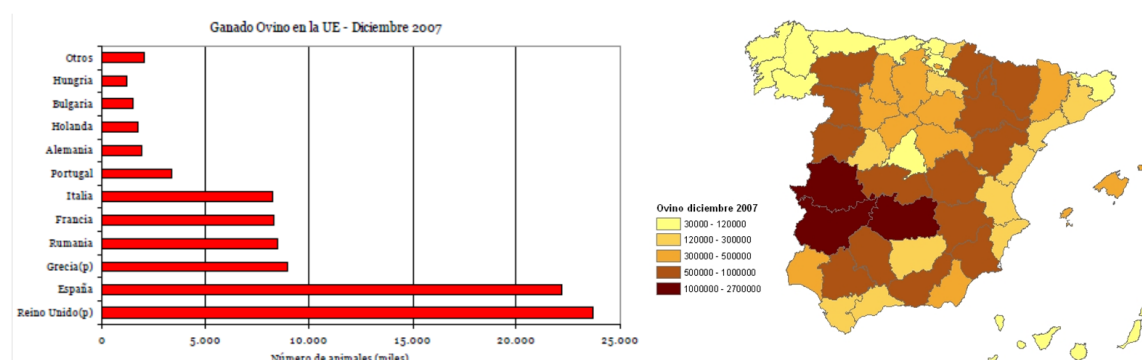


Figura 7. Ganado ovino en la Unión Europea y mapa de distribución de ganado ovino en España, 2007 (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2007).

Provincias	Corderos	Sementales	Hembras	Representación ganado ovino dentro de España	Distribución del ganado ovino dentro de Galicia
Coruña	3.963	4.182	34.696	0,19%	15,51%
Lugo	5.818	5.068	68.137	0,36%	28,60%
Ourense	8.076	5.313	97.964	0,50%	40,30%
Pontevedra	3.722	3.908	35.455	0,19%	15,59%
GALICIA	21.579	18.471	236.252	1,24%	
ESPAÑA	3.658.291	498.266	18.037.700		

Tabla 5. Análisis provincial del número de ovinos según tipología, 2007 (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2007).

CABEZAS	CORUÑA		LUGO		ORENSE		PONTEVEDRA		GALICIA	
EXPLOTACIÓN	Explot.	Cabezas	Explot.	Cabezas	Explot.	Cabezas	Explot.	Cabezas	Explot.	Cabezas
<10	4.843	17.430	5.914	21.885	2.446	10.312	6.890	21.570	20.093	71.197
10 a 49	861	14.691	1.561	29.246	1.361	26.936	807	13.105	4.590	83.978
50 a 99	29	1.837	165	11.614	224	15.742	36	2.464	454	31.657
100 a 249	15	2.301	93	13.851	177	28.045	21	3.257	306	47.454
> 249	7	3.388	22	9.788	78	32.207	1	273	108	45.656
TOTALES	5.755	39.647	7.755	86.384	4.286	113.242	7.755	40.669	25.551	279.942

Tabla 6. Estructura productiva por tamaño de explotación (Consellería de medio Rural, 2007). Explot.: número de explotaciones.

Los datos mostrados en la tabla 6 muestran que la mayoría de los rebaños gallegos son de pequeño tamaño y de carácter familiar, destinando la mayor parte de los animales al autoconsumo. Sin embargo, cerca de un 2% de las explotaciones presentan más de 100 cabezas, con una media de 225 animales por rebaño (Tabla 6). Estas granjas son en su mayoría de ovino de carne y tienen una orientación más profesional. Además, sus propietarios, tanto semiprofesionales como profesionales, forman parte de la Asociación de Defensa Sanitaria Ganadera (ADSG) de ovino y caprino de Galicia ACIVO, la única centrada en las especies ovina y caprina en Galicia y que cuenta con un equipo de veterinarios especializados responsable de llevar a cabo los distintos programas sanitarios. Cabe destacar que la presencia de cabras conviviendo en un contacto más o menos estrecho con las ovejas es muy frecuente en las explotaciones de la zona de estudio, suponiendo aproximadamente un 10% del total de rebaños ovinos (tabla 7).

	Nº EXPLOTACIONES	Nº OVEJAS	Nº CABRAS
EXPLOTACIONES OVINAS	19.677	181.940	-
EXPLOTACIONES CAPRINAS	2.855	-	18.730
EXPLOTACIONES MIXTAS	2.756	54.284	24.988
TOTALES	25.288	236.224	43.718

Tabla 7. Estructura de los rebaños en Galicia por tipología (Consellería de Medio Rural, 2007).

3.2. EXPLOTACIONES ESTUDIADAS, TOMA DE MUESTRAS Y RECOGIDA DE DATOS

3.2.1 Explotaciones incluidas en el estudio

Un total de 78 explotaciones semiintensivas de ovino de carne de Galicia (55 rebaños puros y 23 mixtos), todas ellas pertenecientes a la Asociación de Defensa de Ovino y Caprino de Galicia “ACIVO”, accedieron a formar parte del estudio de forma voluntaria. La selección de los rebaños no fue, por lo tanto, aleatoria, aunque los 78 rebaños incluidos finalmente en el estudio se encontraron distribuidos por todas las zonas agro-ganaderas de Galicia, representando aproximadamente el 20% del total de los rebaños con orientación comercial. En cada explotación se tomaron muestras de sangre de todos los ovinos mayores de seis meses, alcanzando un total de 15.155 animales. A su vez, y con objeto de analizar la presencia de larvas de nematodos broncopulmonares en cada rebaño, se recogieron muestras de heces a un porcentaje representativo de la población. Para ello se consideró una prevalencia de parasitación del 15% (López, comunicación personal), un intervalo de confianza del 95% y una potencia del 90%. La selección de estos animales dentro del rebaño fue totalmente aleatoria. El tamaño medio de los rebaños estudiados fue de 195 ovejas (rango 50-1231) con un promedio de 18 cabras por rebaño en el caso de las explotaciones mixtas.

El área de estudio se clasificó en dos zonas, según las condiciones orográficas y bioclimáticas (Figura 8): la **zona costa-centro**, con precipitaciones (900-1500 mm) y temperaturas moderadas ($\bar{x}=12,3^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{min}}=8,0^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{max}}=17,1^{\circ}\text{C}$); y la **zona de montaña**, caracterizada por altas precipitaciones (>1500 mm) y bajas temperaturas ($\bar{x}=10,1^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{min}}=5,6^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{max}}=14,7^{\circ}\text{C}$). Estas diferencias condicionan el manejo de los animales. Así, en la zona costa-centro los animales pastan en pequeños prados localizados cerca del establo durante las horas de luz y se estabulan al anochecer. Por el contrario, los rebaños de la zona de montaña suelen permanecer en los prados durante semanas sin ser estabulados, sobre todo durante los periodos cálidos. Otra diferencia a tener en cuenta entre ambas zonas climáticas es la localización y tamaño de los pastos empleados. En la zona de montaña los pastos suelen estar localizados

lejos de los establos y ser de mayor tamaño que los empleados en la zona costa-centro.

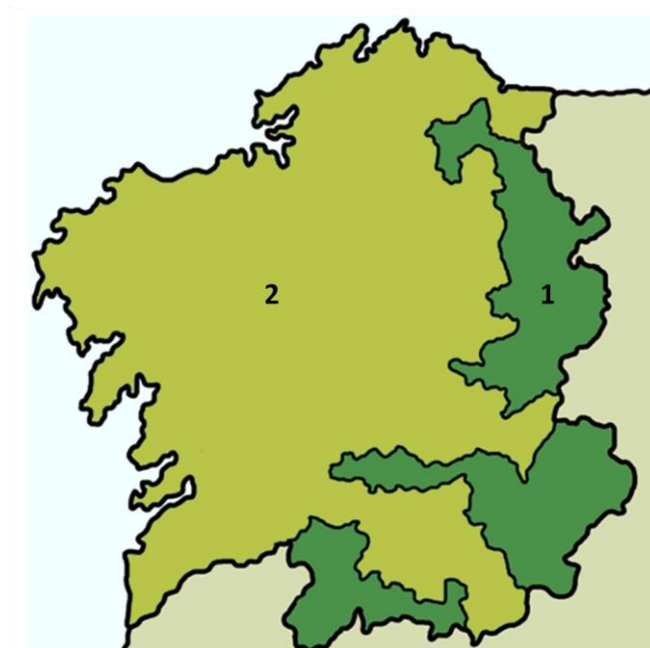


Figura 8. Zonas (1= Montaña, 2= Costa-centro) en las que se divide Galicia según las principales condiciones orográficas y climáticas.

El manejo de la cría es el típico de rebaños semiintensivos de carne, de modo que los corderos permanecen estabulados con sus madres en grupos de 5-10 animales durante unos 3-7 días tras el parto. Posteriormente, los corderos o bien se integran dentro del rebaño adulto, o bien se mantienen sin salir al pasto en un redil separado del resto de animales hasta el destete. Sin embargo, todos son criados por sus madres hasta el destete, que ocurre a los 2-3 meses de edad. En el caso de los corderos mantenidos como un grupo independiente del rebaño adulto, se les permite el contacto con su madre una o dos veces al día para poder ser amamantados.

Cabe destacar que ningún ganadero de los incluidos en el estudio había llevado a cabo, al menos de manera consciente, alguna medida de prevención o control del MV, desconociéndose por lo tanto el estado sanitario del rebaño ante la enfermedad. Sin embargo, en todas las explotaciones aplicaban tratamientos antihelmínticos. La mayoría de los rebaños gallegos con orientación productiva desparasitan de manera

rutinaria a los animales al menos una vez al año, generalmente en otoño, empleando bencimidazoles y, en menor medida, lactonas macrocíclicas (Pedreira *et al.*, 2006).

3.2.2. Toma de muestras y conservación

La toma de muestras se realizó entre marzo de 2007 y enero de 2009. Las muestras de sangre se recogieron mediante punción en la vena yugular empleando tubos estériles al vacío BD Vacutainer® CAT de 10 ml, sin anticoagulante. Con objeto de evitar la seropositividad debida a los anticuerpos calostrales, solo se tomaron muestras de animales mayores de seis meses (Cutlip *et al.*, 1988). Las muestras fecales se recogieron directamente del recto de los animales empleando guantes de plástico y se identificaron de forma individual. En el momento de la toma de muestras, se registró para cada animal su número de identificación oficial, así como la especie, el género y el número de muestra asignado. Las muestras se numeraron de forma consecutiva llevando siempre el número de referencia de la explotación de origen.

Una vez obtenidas, las muestras sanguíneas se trasladaron al laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de Lugo, donde se dejaron en refrigeración unas 24 horas para favorecer la retracción del coágulo y el posterior desuerado. Tras este periodo de tiempo, las muestras se centrifugaron a 3000 x g durante 10 minutos en una centrífuga modelo Mixtasel (P SELECTA®, España), y posteriormente el suero se dispensó en placas de ELISA de 96 pocillos, que se numeraron de forma consecutiva (Figura 9). Estas placas madre se conservaron en congelación a -20°C hasta la realización de la prueba diagnóstica. En cuanto a las muestras de heces, se trasladaron al laboratorio de Parasitología y Enfermedades parasitarias de la Facultad de Veterinaria de Lugo donde, el mismo día de la toma de muestras, se realizó la migración larvaria, así como otras técnicas coprológicas no empleadas en este estudio.

FECHA:
PLACA Nº:
OBSERVACIONES:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 9. Tabla de registro de sueros según Nº de tubo asignado.

3.2.3. Toma de datos de animales y explotaciones

En cada explotación incluida en el estudio se llevó a cabo una encuesta epidemiológica al propietario de la explotación, realizada por un miembro del equipo investigador. La encuesta constaba, entre otros, de los siguientes apartados:

- Datos de la explotación: se recogieron datos referentes al titular de la explotación, código de explotación agraria, localización de la misma, tipo y orientación productiva, censo, proximidad de otras explotaciones y presencia o no de caprinos en la misma.
- Incorporación de animales en los últimos 5 años: se anotaron todas las incorporaciones realizadas en los cinco años previos al estudio, especificando el año, el número y origen de los animales incorporados y las medidas de cuarentena realizadas.
- Antecedentes sanitarios de la explotación: se tomaron datos relativos a la realización o no de desparasitaciones, así como los productos empleados.

Así, en cuanto al manejo de los corderos se tomó la siguiente información:

- A los pocos días del parto se agrupan con:
 - ☐ El resto del rebaño
 - ☐ Se hace un grupo de corderos que se mantienen juntos en estabulación permanente (nº de animales máximo por grupo): ____

A través de las hojas de calificación sanitaria de la explotación, se verificó el censo y se obtuvo la edad de los individuos expresada en meses, tomando como referencia la fecha de nacimiento de los individuos y la fecha del muestreo.

3.3. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EMPLEADAS

3.3.1. Muestras de Heces

Las muestras fecales se procesaron mediante el método de migración larvaria de Baermann-Wetzel, con objeto de obtener larvas de primer estadio de nematodos pulmonares (Figura 10). Para ello se pesaron 10 gramos de cada muestra y se envolvieron en una capa de tejido no tejido (Filter-Lab, Filtros Anioia, S.A., Barcelona, España). Posteriormente, se colocaron en el interior de aparatos de migración larvaria Baermann y se cubrieron con agua tibia, para favorecer la migración de las larvas de los nematodos pulmonares desde el interior de las heces al exterior del tejido. Una vez que las larvas alcanzan el agua, por gravedad caen a la parte inferior del embudo. Las muestras se dejaron migrando 24 horas, transcurridas las cuales se recogió el primer líquido en un tubo de vidrio de 10 ml. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 170 x g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y aproximadamente el último mililitro, donde se encontraba la población larvaria, se conservó para el posterior recuento e identificación. Se hizo el recuento total de larvas de cada muestra en una cámara de Favatti, contabilizándose las larvas de primer estadio (L1) de protostrongílidos y de *Dictyocaulus filaria*. Las diferentes especies de protostrongílidos se identificaron basándose en las descripciones de Díez-Baños *et al.* (1999). En todos

los casos se identificaron al menos 100 larvas por cada animal salvo en los casos donde no se alcanzaba este mínimo, siendo identificadas en su totalidad.

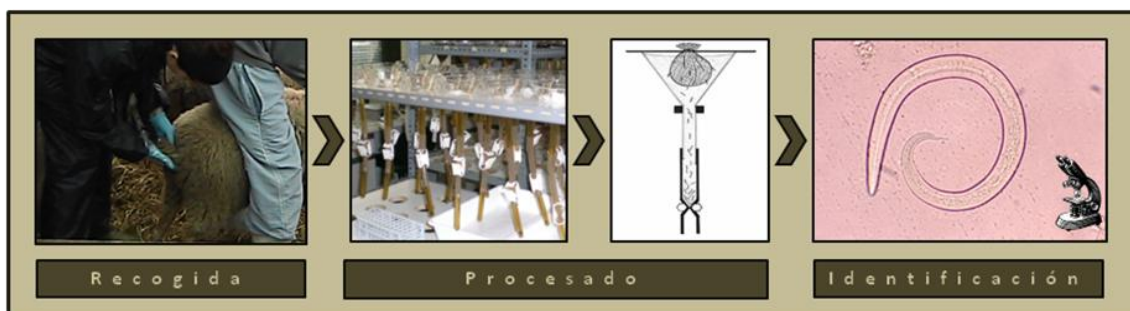


Figura 10. Esquema del procesamiento de las muestras de heces.

3.3.2. Muestras Sanguíneas

Las muestras sanguíneas fueron analizadas mediante un ensayo comercial de inmunoabsorción enzimática (ELISA) de tipo indirecto (Pourquier® Maedi Visna/CAEV, Indirect ELISA/Screening, Institut Pourquier, Francia), para determinar la presencia de anticuerpos frente al VMV en el suero (Figura 11). Este test emplea como moléculas antigénicas péptidos inmunogénicos transmembrana (proteína de TM, gen *env*) y la proteína recombinante P28, que forma parte de la cápside viral (gen *gag*). El uso de estas proteínas muy bien conservadas permite la detección de un amplio espectro de variantes serológicas, demostrándose una sensibilidad y especificidad del 98% y 97%, respectivamente (Toft *et al.*, 2007).

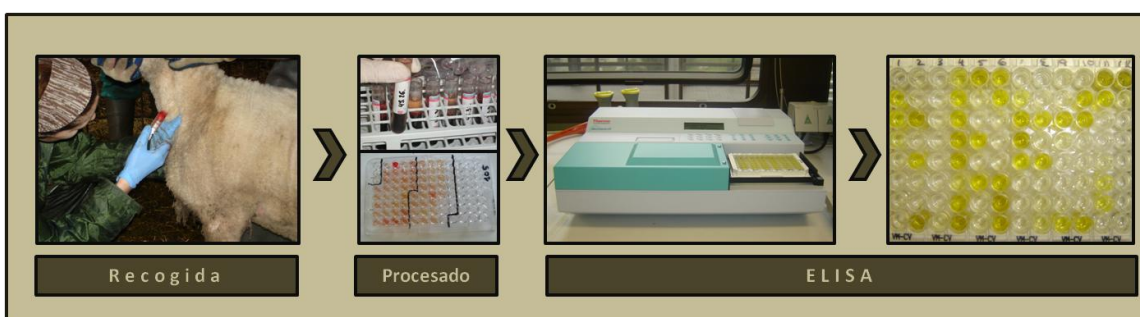


Figura 11. Esquema del procesamiento de las muestras sanguíneas.

3.3.2.1. **Equipos, materiales y reactivos empleados en el test ELISA**

Los materiales y equipos usados, no incluidos en el kit comercial, fueron los que se citan a continuación:

1. Lector de microplacas (Multiskan Ascent, Thermo Scientific®, Waltham, Massachusetts).
2. Agitador de microplacas PSU-2T plus (Lan Technics®, Navarra).
3. Micropipetas de precisión, simples y multicanal (Labnet Biopette®, Woodbridge, Virginia).
4. Puntas de pipetas desechables.
5. Agua destilada.
6. Film adhesivo sellador de microplacas.
7. Estufa.

Los materiales y reactivos incluidos en el test comercial fueron los siguientes:

1. Microplacas antigenadas.
2. Solución de lavado concentrada.
3. Tampón de dilución para las muestras.
4. Tampón de dilución para el conjugado.
5. Controles positivos y negativos.
6. Conjugado (anti-IgG de rumiantes-peroxidasa).
7. Solución de revelado TBM.
8. Solución de parada (H_2SO_4 , solución 0,5M).

3.3.2.2. **Procedimiento del Ensayo**

Todos los reactivos se mantuvieron a temperatura ambiente por lo menos una hora antes de ser empleados, salvo el conjugado y los controles, que debían permanecer en refrigeración hasta su uso, tal como indicaban las instrucciones del fabricante.

El protocolo llevado a cabo fue el indicado por la casa comercial, el cual se especifica a continuación:

A) Dilución de sueros controles y muestras a una dilución 1/20. Se dispensó en cada pocillo de la placa antigenada (Figura 12) los siguientes reactivos:

- 190µl de buffer de dilución.
- 10µl de sueros no diluidos (desde la placa madre, con pipeta multicanal):
 - Pocillo A1: control negativo.
 - Pocillo B1 y C1: control positivo.
 - Resto pocillos: sueros problema.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	6										
B	+	7										
C	+	8										
D	1	9										
E	2	10										
F	3	...										
G	4	...										
H	5	...										

Figura 12. Esquema de dispensación de sueros control y problema en la placa ELISA

El contenido de los pocillos debe homogeneizarse por agitación suave de la placa usando un agitador de microplacas.

B) Primera incubación: cubrir la placa con adhesivo e incubar 1 hora (± 5 minutos) a 37°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$).

C) Primer lavado:

- Vaciar el contenido de las placas.
- Rellenar los pocillos con 275µl de la solución de lavado de trabajo y vaciar posteriormente. Repetir este procedimiento dos veces más. Tras el último lavado se debe golpear la placa sobre un papel secante para realizar un correcto vaciado de pocillos.

- Las placas podrán permanecer con la solución de lavado hasta una hora sin variar la validez del test.
- D) Adición del conjugado:
- Dispensar 100µl de la solución de conjugado de trabajo por pocillo, desechando la solución sobrante.
- E) Segunda incubación:
- Cubrir la placa con adhesivo e incubar durante 30 minutos (± 3 min) a 37°C ($\pm 3^\circ\text{C}$).
 - Durante esta incubación se debe preparar la solución de revelado en una cubeta de dispensación de pipeta multicanal (conservar preservado de la luz hasta su uso).
- F) Segundo lavado:
- Vaciar el contenido de las placas.
 - Rellenar los pocillos con 275µl de la solución de lavado de trabajo y vaciar posteriormente. Repetir este procedimiento dos veces más. Al igual que en el lavado anterior, tras el último lavado se debe golpear la placa sobre un papel secante para realizar un correcto vaciado de pocillos.
- G) Adición de la solución de revelado: añadir 100µl de solución de revelado por pocillo.
- H) Tercera incubación: incubar las placas a 21 °C ($\pm 5^\circ\text{C}$) durante 20 minutos sin luz (puede variarse ± 10 minutos según las condiciones del laboratorio).
- I) Parada de reacción:
- Dispensar 100µl de la solución de parada por pocillo.
 - Agitar la placa en agitador hasta que la solución coloreada sea homogénea.
 - Secar cuidadosamente la parte inferior de las placas.
 - Mantener en oscuridad como máximo una hora hasta la lectura.

J) Lectura:

- Calibrar el espectrofotómetro en blanco.
- Realizar la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450nm.

3.3.2.3. **Expresión e interpretación de los resultados obtenidos**

Los criterios de validación empleados fueron los especificados por el fabricante, considerándose un resultado válido cuando:

- El suero positivo control tiene un valor medio de densidad óptica (DO) superior a 0,350.
- El ratio entre el valor medio de los sueros positivos controles y el del suero negativo control es mayor o igual a 3,5.

Para el cálculo y la interpretación de los resultados se empleó el software Ascent, Versión 2.6. Conforme a las indicaciones del fabricante, se determinó para cada muestra el ratio S/P:

$$S/P = 100 \times \frac{(\text{DO de la muestra} - \text{DO del control negativo})}{(\text{DO medio control positivo} - \text{DO del control negativo})}$$

Posteriormente se interpretaron dichos valores, de modo que la muestra se consideraba negativa, dudosa o positiva según el ratio S/P obtenido:

NEGATIVO: si ratio S/P es igual o inferior a 110%
DUDOSO: si ratio S/P entre 110 y 120%
POSITIVO: si ratio S/P es mayor o igual a 120%

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para llevar a cabo el análisis estadístico se emplearon los programas SPSS versión 18.0 y SPSS Answer Tree, versión 3.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3.4.1. Estudio 1: Seroprevalencia del VMV en explotaciones de ovino de carne y estudio de los factores de riesgo de la enfermedad

Las **variables dependientes** empleadas fueron la seropositividad a nivel de rebaño y la seropositividad individual de los animales. Las **variables independientes** o valores predictivos empleados fueron seleccionados en base a una rigurosa revisión bibliográfica así como al posible impacto que los diferentes tipos de manejo pudieran ejercer sobre la seroprevalencia del MV. Las variables independientes incluidas como variables fijas se resumen en la Tabla 8:

VARIABLES	CATEGORÍAS
ZONA GEOGRÁFICA	Montaña Costa-centro
TAMAÑO DE REBAÑO	Pequeños (1-95 ovejas) Medianos (96-194) Grandes (>194)
CONTACTO OVINO-CAPRINO	Rebaños formados exclusivamente por ovinos Rebaños mixtos con bajo grado de contacto entre ambas especies (<i>presencia de al menos un caprino en la explotación aunque se realiza una gestión independiente de ambas especies, ambas comparten la misma cuadra, aunque distintos rediles</i>) Rebaños mixtos con alto grado de contacto entre ambas especies (<i>presencia de al menos un caprino en la explotación, estando plenamente integradas en el rebaño de ovejas</i>)
NÚMERO DE OVINOS INCORPORADOS EN LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS	Bajo nº de incorporaciones (<i>menos de 9 ovejas; todos los rebaños introdujeron al menos un animal en los últimos cinco años</i>). Alto nº de incorporaciones (<i>más de 9 ovejas</i>)
TIPO DE ALOJAMIENTO DE LOS CORDEROS HASTA EL DESTETE	Grupo No: <i>los corderos están con su madre 3-7 días y posteriormente se unen con el rebaño adulto.</i> Grupo Si: <i>los corderos están con su madre 3-7 días y posteriormente se mantienen estabulados juntos en confinamiento total hasta el destete, alrededor de los 3 meses de edad.</i>
EDAD	6-12 meses 13-48 meses > 48 meses
SEXO	Machos Hembras
ÉPOCA DE NACIMIENTO	Primavera Verano Otoño Invierno

Tabla 8. Variables independientes empleadas en el estudio de los factores de riesgo asociados con el virus del MV en rebaños semiintensivos de carne en el noroeste de España.

Debido a que tanto la sensibilidad como la especificidad de la prueba diagnóstica empleada (ELISA) no alcanzan el 100% (Toft *et al.*, 2007), el criterio empleado para clasificar una explotación como positiva fue presentar una seroprevalencia real (PR) $\geq 1\%$. Para el cálculo de la misma se empleó la fórmula descrita por Thrusfield (2005):

$$PR = \frac{P + \text{especificidad} - 1}{\text{sensibilidad} + \text{especificidad} - 1}$$

La identificación de las principales variables asociadas con la seroprevalencia se realizó tanto a nivel de rebaño como a nivel individual. El estudio de la asociación entre los factores de riesgo y la seroprevalencia a **nivel de rebaño** se realizó en dos pasos. En primer lugar, se realizó el test de Chi-cuadrado que identifica las variables de exposición significativamente relacionadas con la seropositividad (individual/rebaño). Las variables estudiadas fueron las descritas en la Tabla 8, a excepción de la edad, sexo y época de nacimiento, al tratarse de valores individuales. Las variables con un valor de $p \leq 0,1$ en el test Chi-cuadrado fueron seleccionadas para realizar el análisis de regresión logística multivariante, previa comprobación de ausencia de colinealidad entre las mismas. Las variables se introdujeron o se eliminaron del modelo con dos valores de p , 0,05 y 0,1, respectivamente. Se calculó el Odds Ratio (OR) de cada posible factor de riesgo en el modelo para medir la fuerza de la asociación, con intervalos de confianza del 95% (95% IC).

En cuanto a la identificación de los factores de riesgo asociados a la seropositividad a **nivel individual**, se realizó un análisis de regresión lineal múltiple empleando las Ecuaciones de Estimación Generalizadas (GEE). Este método es una extensión de los modelos de regresión logística donde se tiene en cuenta la correlación existente intragrupo en la estimación de los parámetros de regresión de un modelo y permite evitar sesgos en el estudio de datos con estructura jerárquica (Liang y Zeger, 1986; Carbonero *et al.*, 2011), justificándose por lo tanto su aplicación en el análisis de los factores de riesgo a nivel individual, ya que los objetos de estudio (ovejas) se encuentran distribuidos en conglomerados o jerarquías (rebaños). Así, la variable

dependiente considerada fue el estatus serológico de cada individuo, mientras que el rebaño al que cada animal pertenecía se consideró un factor aleatorio. Se emplearon todas las variables descritas en la Tabla 8, a excepción de la zona geográfica, al encontrarse en un nivel jerárquico superior al de rebaño (Figura 13).

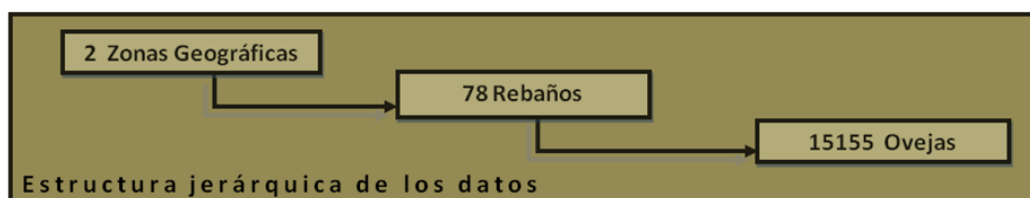


Figura 13. Diagrama jerárquico de los datos.

En un primer paso se realizó el análisis univariable de los distintos factores con una prueba de Chi-Cuadrado, incluyéndose posteriormente en el modelo GEE aquellas con un valor $p \leq 0,1$ y que no presentaban colinealidad. Las variables se eliminaron del modelo una por una según los valores obtenidos de p , ajustándose el modelo hasta que todas las variables presentaban un valor de p estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Posteriormente, se evaluaron todas las interacciones biológicamente posibles entre las variables que formaban el modelo.

Al no incluirse la zona geográfica en el análisis GEE, se analizaron separadamente los datos pertenecientes a cada zona empleando modelos tradicionales de regresión logística. El primer paso realizado para el análisis por zona geográfica a nivel individual, fue el test de Chi-cuadrado teniendo en cuenta las variables descritas en la Tabla 8. Posteriormente, aquellas variables con un valor de $p \leq 0,1$ en dicho test fueron seleccionadas para ser incluidas en el modelo de regresión logística multivariable, analizándose previamente la ausencia de colinealidad. Las variables se introdujeron o se eliminaron del modelo con dos valores de p , 0,05 y 0,1, respectivamente. Se calculó el Odds Ratio (OR) de cada factor de riesgo en el modelo para medir la fuerza de la asociación, con límites de confianza del 95% (95% IC).

De modo complementario, se realizó un estudio de las variables mediante el detector de interacción automatizada de Chi-cuadrado (CHAID) o árbol de clasificación, siendo el algoritmo utilizado para determinar diferencias significativas en la

seroprevalencia individual (sobre el total de los datos y según zona geográfica: montaña o costa-centro) entre los factores significativos en el estudio univariable. El CHAID es un árbol de clasificación basado en las pruebas de significación ajustada, el cual ofrece la ventaja de clasificar las variables por su orden de importancia o significación. Además proporciona unos resultados muy visuales y fáciles de interpretar, de ahí su empleo en este estudio.

3.4.2. Estudio 2: Cálculo inferido de la incidencia del MV a partir de datos transversales

Para la realización de este análisis se tomó como referencia el método publicado y validado por Rajan y Sokal (2010), con el que se puede obtener, a partir de datos de prevalencia de una enfermedad, una estimación de la incidencia de la misma en dicha población. El método requiere mínima información histórica, partiendo de datos transversales, sin la necesidad de realizar un estudio de cohortes o longitudinal, los cuales, además de ser más laboriosos, son también económicamente más costosos. En su origen el análisis se desarrolló para el virus de la inmunodeficiencia adquirida humana (VIH), pero debido a la similitud entre ambos virus puede ser aplicado al VMV. Los parámetros requeridos para la estimación de la incidencia son los siguientes:

- 1- Prevalencia de la enfermedad del Maedi Visna por grupos de edad, obtenidos a partir del estudio 1 de este trabajo.
- 2- Tamaño de muestra conocido, para poder estimar la incidencia acumulada (IA).

Para la aplicación del modelo matemático es necesaria la aceptación de determinadas suposiciones válidas para el VIH, que por extensión, debido a las similitudes entre ambos virus, son aplicables al caso del VMV. Así tenemos que:

- La infección en la población se considera estable. Se asume que la prevalencia observada para un grupo de edad “a”, será la prevalencia observada para los animales más jóvenes que “a” cuando alcancen dicha edad “a”.

- La prevalencia observada para cada grupo de edad es la prevalencia en el punto medio del rango de edad.
- En la ausencia de datos para animales menores de seis meses, se asume que la prevalencia en este nivel es cero.
- Para calcular la prevalencia puntual al comienzo y final de cada grupo de edad, se supone que el aumento (o disminución) en la prevalencia es lineal, desde el punto medio de un grupo de edad hasta el punto medio del grupo de edad posterior. Por ejemplo, un aumento de la prevalencia de un 10% a la edad de 2 años y el 12% a la edad de 4 años, implicaría un aumento del 1% cada año.
- La tasa de incidencia dentro de cada grupo de edad se calcula utilizando una función de probabilidad exponencial, y suponiendo una tasa de incidencia uniforme dentro de cada grupo de edad.
- Con el fin de simplificar la estimación IA, se supone que la aparición de nuevos casos de Maedi Visna en cada grupo de edad tiene una distribución de Poisson. El supuesto de distribución de Poisson solamente es necesaria para el cálculo de la IA.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, la fórmula final empleada fue la siguiente:

$$i_a = 1 - \left\{ \frac{1 - (P_{a+n} - P_a)}{(1 - P_a)} \right\}^{1/n}$$

Donde i_a es la incidencia del grupo "a" de edad para una determinada población, P_a es la prevalencia al comienzo del grupo de edad "a", y $a + n$ es el incremento en el grupo de edad (Rajan y Sokal, 2010). Resaltar que en este trabajo se hizo un ajuste final al modelo ya que en el caso del VIH hay un método preventivo que

interfiere en la evolución natural de la enfermedad, el cual al no existir en el caso del MV, no se ha tenido en cuenta.

Para poder aplicar el método, se tomaron los datos obtenidos en el estudio 1 de este trabajo. De las 78 explotaciones iniciales, se tomaron en cuenta aquellas que habían sido consideradas positivas tras analizar los resultados del test ELISA. El criterio para considerar una explotación positiva fue presentar una seroprevalencia real mayor al 1%, obteniéndose 41 explotaciones positivas con un total de 11.015 animales, siendo la seroprevalencia individual del VMV de un 33,90%. En la tabla 9 se recoge la clasificación por grupos de edad dependiendo del resultado de la prueba diagnóstica ELISA, así como el número de animales que formaron parte de cada grupo. Se descartaron aquellos animales de más de diez años.

Edad (años)	ELISA -	ELISA +
0,5-2	1653	313
2-4	2069	983
4-6	1621	986
6-8	865	662
8-10	630	489

Tabla 9. Distribución de los animales según su estatus serológico y rango de edad.

A continuación se aplicó el método descrito por Rajan y Sokal (2010) tanto a nivel general como según el área geográfica. Asimismo, con el fin de identificar posibles diferencias al tener en cuenta los factores de riesgo identificados en la primera parte de este estudio, se aplicó la fórmula teniendo en cuenta el tipo de cría realizado antes del destete y el grado de contacto ovino caprino.

3.4.3. Estudio 3: Estudio de la relación entre parásitos broncopulmonares y el Maedi Visna

Para la realización de este estudio se emplearon como variables independientes aquellas obtenidas como factores de riesgo en el estudio de la

seroprevalencia del MV a nivel individual, es decir, aquellas variables obtenidas en el modelo final de la ecuación de estimación generalizada. Se agruparon y categorizaron dichas variables (Tabla 10) con el fin de ser analizadas conjuntamente con los datos obtenidos en el estudio coprológico. Para ello se realizó previamente una transformación logarítmica del recuento larvario de protostrongílidos y *D. filaria* a fin de poder emplear los datos como una variable continua en el análisis estadístico. Las variables utilizadas finalmente se encuentran resumidas en la Tabla 10.

Variables	Categorías
TIPO DE ALOJAMIENTO DE LOS CORDEROS HASTA EL DESTETE	Grupo No: <i>los corderos están con su madre 3-7 días y posteriormente se unen con el rebaño adulto.</i> Grupo Si: <i>los corderos están con su madre 3-7 días y posteriormente se mantienen estabulados juntos en confinamiento total hasta el destete, alrededor de los 3 meses de edad.</i>
TAMAÑO DE REBAÑO	Pequeños (1-95 ovejas) Medianos (96-194) Grandes (>194)
EDAD	6-12 meses 13-48 meses > 48 meses
CONTACTO OVINO-CAPRINO	Rebaños formados exclusivamente por ovinos y Rebaños mixtos con bajo grado de contacto entre ambas especies (<i>presencia de al menos un caprino en la explotación aunque se realiza una gestión independiente de ambas especies, ambas comparten la misma cuadra, aunque distintos rediles</i>) Rebaños mixtos con alto grado de contacto entre ambas especies (<i>presencia de al menos un caprino en la explotación, estando plenamente integradas en el rebaño de ovejas</i>)
INFECCIÓN POR PROTOSTRONGYLIDOS	Grupo No (Ausencia del parásito en las muestras fecales) Grupo Si (Presencia del parásito en las muestras fecales)
INFECCION POR Dictyocaulus filaria	Grupo No (Ausencia del parásito en las muestras fecales) Grupo Si (Presencia del parásito en las muestras fecales)
LOG_RECUENTO LARVARIO PROTOSTROGYLIDOS	
LOG_RECUENTO LARVARIO Dictyocaulus filaria	

Tabla 10. Variables independientes empleadas en el estudio de los factores de riesgo asociados con el virus del MV y la infección por parásitos broncopulmonares en rebaños semiintensivos de carne en el noroeste de España.

Para el estudio individual de la asociación entre las parasitaciones pulmonares y la infección por el VMV se realizó un test de Chi-cuadrado, obteniéndose los valores de

Odds Ratio, calculados con el método de Fisher y con un intervalo de confianza del 95%. Posteriormente se analizó la posible presencia de factores confusores a través del análisis de regresión logística y el procedimiento de Mantel-Haentszel, estadístico utilizado para determinar cuando dos variables (grupo y acierto) son independientes cuando se condiciona a una tercera variable. Finalmente se realizó el análisis de regresión logística empleando las variables de estudio indicadas anteriormente, aplicándose un algoritmo de selección “Stepwise”, es decir, partiendo de un modelo de regresión simple se fueron añadiendo en cada paso una variable, cotejándose si alguna de las variables que ya estaban presentes en el modelo podía ser o no eliminada. El criterio empleado para elegir el mejor modelo fue el criterio de información de Akaike (AIC).

4. RESULTADOS

4.1. PREVALENCIA DEL VMV EN EXPLOTACIONES DE OVINO DE CARNE Y ESTUDIO DE LOS FACTORES DE RIESGO DE LA ENFERMEDAD

Los resultados obtenidos muestran que el 70,5% de las explotaciones estudiadas presentaron al menos un animal seropositivo a VMV. Sin embargo, al tener en cuenta la prevalencia real (PR), el porcentaje disminuyó, siendo el 52,6% de las explotaciones las que presentaron una $PR \geq 1\%$. Las mayores diferencias entre la seroprevalencia real y la aparente se encontraron en aquellas explotaciones con una baja seroprevalencia. La distribución obtenida empleando una clasificación similar a la descrita por Pérez *et al.* (2010) se resume en la Tabla 11, donde observamos que dentro de los rebaños seropositivos, los de media seroprevalencia fueron los más abundantes. Además, un 65,5% de los rebaños formados exclusivamente por ovinos presentó al menos un animal seropositivo, en comparación con el 82,6% de los rebaños mixtos. Al tener en cuenta la PR, estos valores disminuyen ligeramente: un 49,9% de los rebaños formados exclusivamente por ovinos presentó una $PR \geq 1\%$, frente al 60,86% de los rebaños mixtos.

Seroprevalencia	Nº Rebaños	Nº Zona Montaña	Nº Zona Costa-centro
Negativa (<1%)	38 (48,7%)	8 (47,1%)	30 (49,2%)
Baja (1-25%)	14 (18,0%)	6 (35,3%)	8 (13,1%)
Media (26-50%)	21 (26,9%)	1 (5,9%)	20 (32,8%)
Alta (>50%)	5 (6,4%)	2 (11,8%)	3 (4,9%)

Tabla 11. Distribución de los rebaños según la seroprevalencia real obtenida.

En cuanto a la seroprevalencia individual, un 24,8% de los ovinos mostraron anticuerpos anti-VMV, siendo la seroprevalencia real ligeramente menor (23,3%).

4.1.1. Factores de Riesgo relacionados con la seropositividad a nivel de rebaño

Tanto en el análisis uni- como multivariable, el criterio establecido para considerar una explotación positiva fue obtener un valor de $PR \geq 1\%$. El análisis univariable de la seropositividad del VMV a nivel de rebaño con relación a diferentes factores de exposición (Test de Chi Cuadrado) se muestra en la Tabla 12.

Variable	Nº	% positivos	OR	95% IC _{OR}	p
Contacto ovino-caprino					
Rebaño exclusivamente ovino ^a	55	49,1	1		0,323
Mixto bajo contacto	7	42,9	0,78	0,16-3,80	
Mixto alto contacto	16	68,8	2,28	0,70-7,44	
Tamaño de rebaño					
Pequeño (n=1-95) ^a	26	19,2	1		<0,001*
Medio (n=96-194)	26	80,8	5,73	1,64-19,94	
Grande (n>194)	26	57,7	17,64	4,44-70,07	
Nº ovinos incorporados					
Bajo (n =1-9) ^a	28	32,1	1		0,007*
Medio-alto (n >9)	50	64,0	3,75	1,41-10,01	
Zona Geográfica					
Montaña ^a	17	52,5	1		0,972
Costa-centro	61	52,9	0,98	0,33- 2,88	
Tipo de alojamiento de los corderos antes del destete					
Grupo No ^a	69	47,8	1		0,013*
Grupo Si	9	88,9	8,73	1,04-73,57	

Tabla 12. Análisis Chi Cuadrado de la seropositividad a nivel de rebaño respecto diferentes factores de riesgo evaluados. OR= Odds Ratio. IC= intervalo de confianza. ^a Categoría de referencia. * Diferencia estadísticamente significativa ($p<0,05$).

Si tenemos en cuenta los resultados del análisis Chi-cuadrado, se obtuvieron diferencias significativas ($p<0,05$) en las variables tamaño de rebaño, número de ovinos incorporados en los últimos cinco años y tipo de alojamiento de los corderos antes del destete, y por lo tanto fueron las que se emplearon en el estudio multivariable (regresión logística binomial).

En el análisis de regresión logística, la variable tipo de alojamiento de los corderos antes del destete fue eliminada del modelo al obtener un valor de $p=0,059$. El modelo final se compuso por lo tanto de las variables tamaño de rebaño y número de ovinos incorporados en los últimos cinco años (Tabla 13). Los rebaños grandes tienen una probabilidad de ser seropositivos 17,70 veces mayor que los rebaños pequeños, siendo este valor menor al comparar los rebaños de tamaño pequeño y medio.

Variable	OR ajustada	95% IC _{OR}	p
Tamaño de rebaño			0,001
Medio (n= 96-194)	4,15	1,13-15,26	0,032
Grande (n >194)	17,70	4,17-75,15	<0,001
Nº ovinos incorporados			
Medio alto (n >9)	3,78	1,14-12,56	0,030

Tabla 13. Análisis de regresión logística de rebaños seropositivos en relación a diferentes factores de exposición evaluados. OR= Odds Ratio. IC= intervalo de confianza.

4.1.2. Factores de Riesgo relacionados con la seropositividad a nivel individual

Los factores de riesgo examinados en el Test de Chi Cuadrado a nivel individual se presentan en la Tabla 14.

Variable	n	%positivos	OR	95% IC	p
Contacto ovino-caprino					
Rebaño exclusivamente ovino ^a	10701	20,2	1		<0,001*
Mixto bajo contacto	1458	27,9	1,52	1,35-1,73	
Mixto alto contacto	2996	39,8	2,6	2,38-2,83	
Tamaño de rebaño					
Pequeño (n=1-95) ^a	1298	4,0	1		<0,001*
Medio (n=96-194)	3992	19,3	5,72	4,28-7,63	
Grande (n>194)	9865	29,8	10,19	7,7-13,5	
Zona geográfica					
Montaña ^a	3062	11,6	1		<0,001*
Costa-centro	12093	28,2	2,98	2,65-3,36	
Nº ovinos incorporados					
Bajo (n =1-9) ^a	4803	20,6	1		<0,001*
Medio-alto (n >9)	10352	26,8	1,42	1,3-1,54	
Tipo de alojamiento de los corderos antes del destete					
No ^a	13606	23,8	1		<0,001*
Si	1549	34,2	1,67	1,49-1,86	
Estación de nacimiento					
Primavera ^a	3207	22,8	1		<0,001*
Verano	3319	27,1	1,26	1,12-1,41	
Otoño	2679	21,6	0,93	0,82-1,05	
Invierno	5950	26,2	1,2	1,08-1,33	
Sexo					
Hembra ^a	14838	17,7	1		0,003*
Macho	317	25,0	1,55	1,16-2,08	
Edad					
6-12 meses ^a	1215	7,2	1		<0,001*
13-48 meses	5888	21,9	3,59	2,87-4,5	
>48 meses	8052	29,6	5,4	4,32-6,74	

Tabla 14. Análisis Chi Cuadrado de la seropositividad individual en relación a los diferentes factores de riesgo evaluados. OR= Odds Ratio. IC= intervalo de confianza. ^a Categoría de referencia. * Diferencia estadísticamente significativa ($p<0,05$).

Todas las variables incluidas se asociaron estadísticamente con la seropositividad frente a VMV, por lo que fueron introducidas en las Ecuaciones de Estimación Generalizadas (GEE). Las variables y las interacciones que formaron parte del modelo final pueden observarse en la Tabla 15. Asimismo, en la Figura 14 podemos observar los resultados obtenidos en el árbol de clasificación CHAID obtenido al tener en cuenta la seropositividad individual de la totalidad de los ovinos.

Factor	β	OR	95% IC _{OR}	<i>p</i>
Tipo de alojamiento de los corderos antes del destete				
Si	2,01	7,46	2,33-23,92	0,001
Tamaño de rebaño				
Medio (n= 96-194)	1,88	6,56	2,32-18,57	<0,001
Grande (n >194)	2,60	13,47	5,27-34,44	<0,001
Contacto ovino-caprino				
Mixto bajo contacto	0,71	2,03	0,86-4,79	0,107
Mixto alto contacto	1,24	3,44	1,87-6,33	<0,001
Edad				
13-48 meses	1,28	3,58	2,07-6,20	<0,001
>48 meses	1,69	5,42	3,20-9,20	<0,001
Interacciones				
TA Si* tamaño medio (n= 96-194)	-2,92	0,05	0,01-0,29	0,001
TA Si*tamaño grande (n>194)	-1,94	0,14	0,06-0,38	<0,001
TA Si*edad 13-48 meses	1,43	4,20	1,97-8,94	<0,001
TA Si*edad >48 meses	1,29	3,63	1,72-7,66	0,001
TA Si*rebaños mixtos alto contacto	-1,96	0,14	0,06-0,31	<0,001

Tabla 15. Análisis GEE de la seropositividad individual a VMV en relación con los diferentes factores de exposición evaluados. OR= Odds Ratio. IC= intervalo de confianza. TA= tipo de alojamiento de los corderos antes del destete.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el análisis GEE (Tabla 15), la seroprevalencia de los animales fue mayor en los rebaños más grandes, mostrando una probabilidad de infección por el VMV más de trece veces superior que aquellos pertenecientes a rebaños más pequeños. Resultados similares se obtuvieron mediante el árbol de clasificación CHAID (Figura 14), siendo la variable tamaño de rebaño la de mayor importancia (primera segmentación).

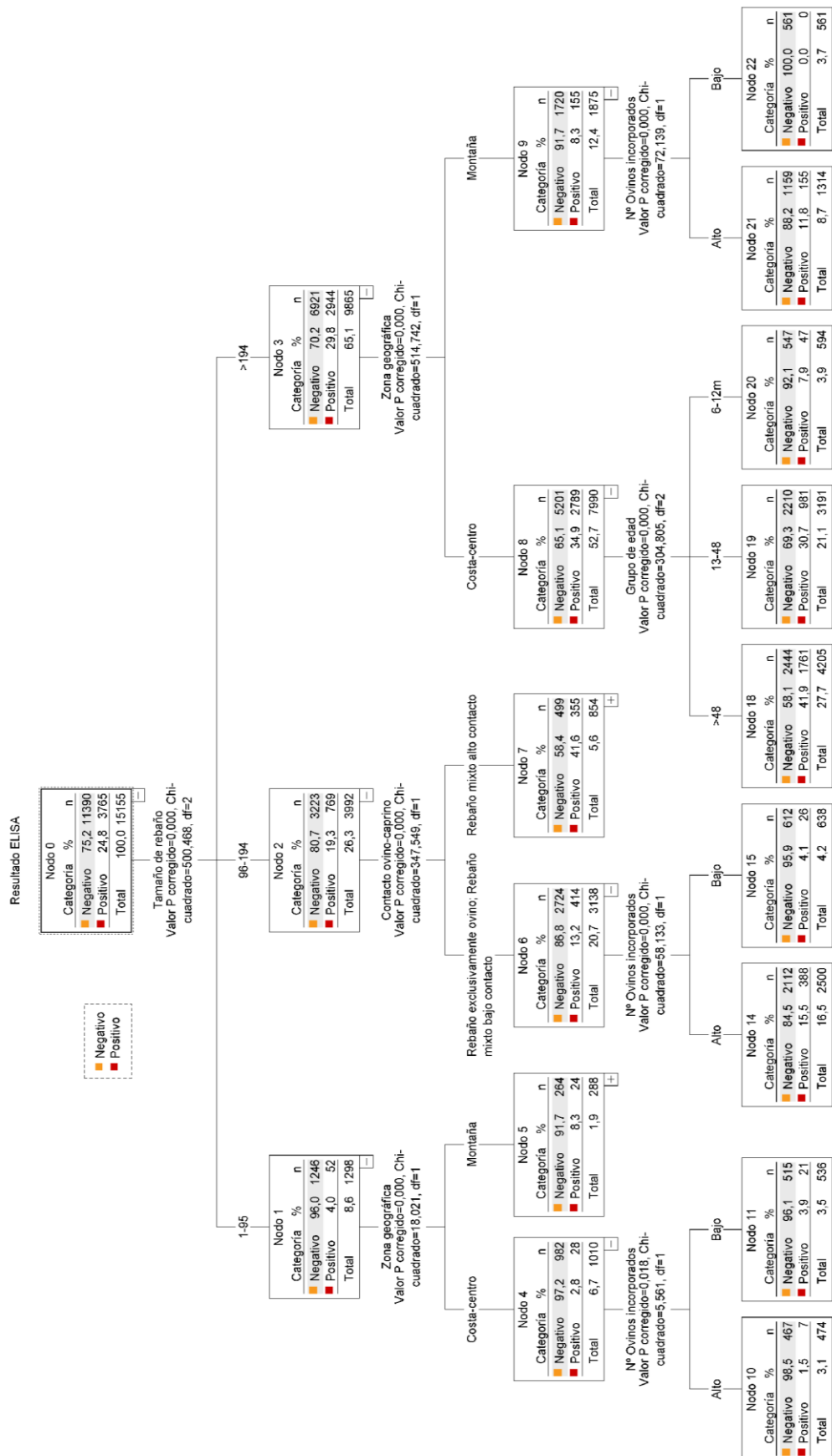


Figura 14. CHAID obtenido al tener en cuenta la seropositividad individual de la totalidad de los ovinos.

Al examinar la variable **zona geográfica** (variable no incluida en el análisis GEE), solo se observan diferencias en cuanto al área estudiada en rebaños pequeños y grandes, pero no en rebaños de tamaño medio (Figura 14), obteniéndose la seroprevalencia más elevada en animales de rebaños grandes de la zona costa-centro. Sin embargo, en rebaños pequeños la relación se invierte y la seroprevalencia es ligeramente mayor en la zona de montaña que en la costa-centro.

Centrándonos en la variable independiente **edad**, la probabilidad de ser seropositivo a VMV fue casi seis veces mayor en las ovejas de más de 48 meses de edad que en los animales más jóvenes (Tabla 15). En la Figura 15, podemos observar gráficamente como la seroprevalencia individual aumentó progresivamente desde los 6-12 meses. Al desglosar los datos según la zona geográfica considerada, en la zona costa-centro se repite la tendencia. Sin embargo, en la zona de montaña, la seroprevalencia permanece en niveles más bajos en todas las edades.

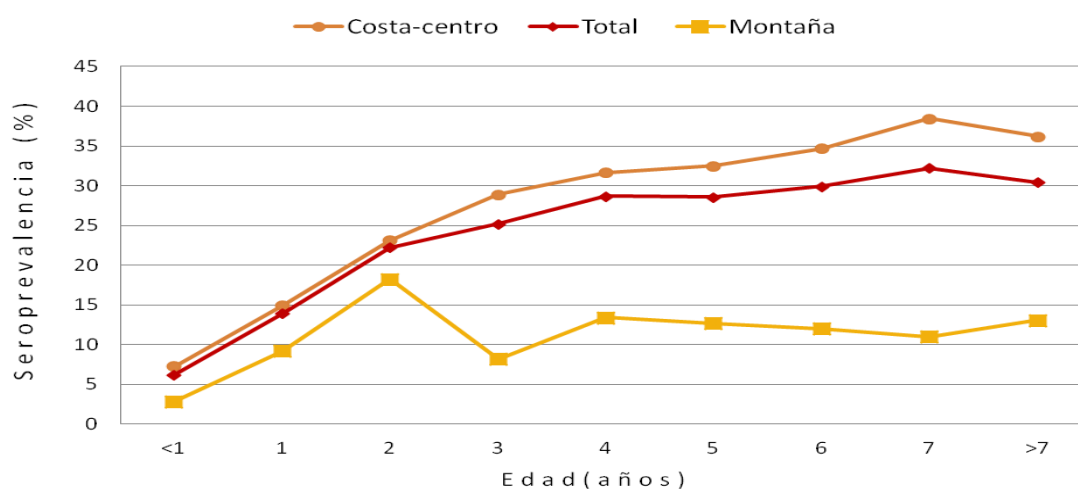


Figura 15. Evolución de la seropositividad de los animales en función de la edad.

Al analizar los valores obtenidos en relación a la variable **contacto ovino-caprino**, la probabilidad de infección por VMV fue tres veces mayor en rebaños mixtos con alto grado de contacto entre ambas especies en comparación con aquellos sin cabras (Tabla 15). En el árbol CHAID (Figura 14), esta variable fue un factor importante en las explotaciones de tamaño medio, observándose diferencias significativas en la

prevalencia del MV en animales de rebaños mixtos con alto grado de contacto y rebaños formados exclusivamente por ovinos o mixtos con bajo grado de contacto.

Finalmente, centrándonos en la variable **tipo de alojamiento de los corderos antes del destete**, aquellos corderos mantenidos como un grupo de recría hasta el destete muestran un riesgo de ser seropositivos al MV siete veces mayor que aquellos corderos que se incorporan con el rebaño adulto a los pocos días del nacimiento (Tabla 15), aun cuando han sido eliminados los posibles efectos aleatorios causados por pertenecer a un determinado rebaño. Sin embargo, en el árbol CHAID (Figura 14), la variable parece no tener importancia o significación.

El algoritmo CHAID señala que la seroprevalencia individual más elevada (Figura 14) se presenta en animales de rebaños de tamaño medio y mixtos con alto grado de contacto entre ambas especies (41,6%) y en aquellos animales adultos (mayores de 13 meses) integrantes de rebaños de gran tamaño de la zona costa-centro (30,7 y 41,9% en animales de 23-48 meses y >48 meses respectivamente). Por el contrario, las seroprevalencias más bajas se observaron en animales de:

- rebaños de pequeño tamaño de la zona costa-centro (2,8%)
- rebaños de tamaño medio: en aquellos rebaños formados exclusivamente por ovinos o con bajo contacto entre ovinos y caprinos y en los cuales el número de animales comprados en los últimos cinco años fue bajo (4,1)
- rebaños de tamaño grande: en rebaños con bajo número de incorporaciones y pertenecientes a la zona de montaña (0%).

4.1.2.1. Relación entre la seropositividad individual al VMV y los factores de riesgo en las diferentes zonas geográficas

En las Tablas 16 y 17 se presentan los resultados obtenidos en el estudio univariable (análisis de Chi Cuadrado) de la seropositividad a nivel de rebaño del VMV en la zona de montaña y en la zona costa-centro, respectivamente.

Factor	n	% positivos	OR	95% IC	p
Contacto ovino-caprino					
Rebaño exclusivamente ovino ^a	2515	8,1	1		<0,001*
Mixto bajo contacto	169	3,6	0,42	0,18-0,96	
Mixto alto contacto	378	38,9	7,25	5,63-9,32	
Tamaño de rebaño					
Pequeño (n=1-95) ^a	288	8,3	1		<0,001*
Medio (n=96-194)	899	19,7	2,70	1,72-4,22	
Grande (n>194)	1875	8,3	0,99	0,63-1,55	
Nº ovinos incorporados					
Bajo (n <10) ^a	846	1,8	1		<0,001*
Medio-alto (n >9)	2216	15,4	10,07	5,97-17,01	
Tipo de alojamiento de los corderos antes del destete					
No ^a	2930	11,2	1		0,001*
Si	132	20,5	2,03	1,31-3,15	
Estación de nacimiento					
Primavera ^a	589	10,7	1		<0,001*
Verano	453	7,1	0,63	0,41-0,99	
Otoño	521	18,8	1,93	1,37-2,72	
Invierno	1499	10,9	1,02	0,75-1,39	
Sexo					
Macho ^a	76	11,8	1		0,953
Hembra	2986	11,6	0,98	0,48-1,98	
Edad					
6-12 meses ^a	262	6,9	1		0,016*
13-48 meses	1074	11	1,67	1-2,8	
>48 meses	1726	12,7	1,98	1,2-3,26	

Tabla 16. Análisis Chi Cuadrado de la seropositividad individual al VMV en relación a diferentes factores de exposición evaluados en la **zona de montaña**. OR= Odds Ratio. IC= intervalo de confianza. ^a categoría de referencia. * Diferencia estadísticamente significativa ($p<0,05$).

Factor	n	% positivos	OR	95% IC	p
Contacto ovino-caprino					<0,001*
Rebaño exclusivamente ovino ^a	8186	24	1		
Mixto bajo contacto	1289	31,1	1,43	1,26-1,63	
Mixto alto contacto	2618	39,9	1,91-2,31		
Tamaño de rebaño					<0,001*
Pequeño (n=1-95) ^a	1010	2,8	1		
Medio (n=96-194)	3093	19,1	8,30	5,64-12,21	
Grande (n>194)	7990	34,9	18,81	12,88-27,46	
Nº ovinos incorporados					<0,001*
Bajo (n <10) ^a	3957	24,6			
Medio-alto (n >9)	8136	29,9	1,31	1,20-1,43	
Tipo de alojamiento de los corderos antes del destete					<0,001*
No ^a	10676	27,2			
si	1417	35,5	1,47	1,31-1,65	
Estación de nacimiento					<0,001*
Primavera ^a	2618	25,5			
Verano	2866	30,3	1,27	1,12-1,43	
Otoño	2158	22,2	0,83	0,73-0,95	
Invierno	4451	31,3	1,33	1,94-1,48	
Sexo					0,002*
Macho ^a	241	19,5			
Hembra	11852	28,4	1,63	1,19-2,25	
Edad					<0,001*
6-12 meses ^a	953	7,3			
13-48 meses	4814	24,3	4,06	3,15-5,22	
>48 meses	6326	34,3	6,57	5,12-8,43	

Tabla 17. Análisis Chi Cuadrado de la seropositividad individual al VMV en relación a diferentes factores de exposición evaluados en la **zona costa-centro**. OR= Odds Ratio. IC= intervalo de confianza. ^a Categoría de referencia. * Diferencia estadísticamente significativa ($p<0,05$).

La totalidad de las variables independientes estudiadas fueron significativas en el análisis univariable por lo que se incluyeron en el análisis de regresión logística de cada una de las zonas geográficas, a excepción del sexo en el caso de la zona de montaña. Los factores asociados a la seropositividad individual al VMV en los modelos finales de regresión logística presentaron diferentes valores de OR según la zona considerada (Tabla 18).

Factor	Zona de montaña			Zona costa-centro		
	OR ajustada	95% IC _{OR}	<i>p</i>	OR ajustada	95% IC _{OR}	<i>p</i>
Contacto ovino-caprino						
Mixto bajo contacto	0,543	0,21-1,36	0,189	1,71	1,49-1,97	<0,001
Mixto alto contacto	26,0	15,21-44,45	<0,001	1,83	1,66-2,03	<0,001
Tamaño de rebaño				3,02	2,73-3,34	<0,001
Medio (n=96-194)	6,02	3,46-10,46	<0,001	6,94	4,7-10,24	<0,001
Grande (n>194)	11,40	5,61-23,16	<0,001	16,77	11,46-24,5	<0,001
Nº ovinos incorporados						
Medio-alto (n >9)	8,14	4,72-14,07	<0,001			
Tipo de alojamiento de los corderos antes del destete						
si	5,73	2,99-10,99	<0,001	1,38	1,22-1,57	<0,001
Edad						
13-48 meses	2,08	1,17-3,70	0,013	4,02	3,11-5,2	<0,001
> 48 meses	3,13	1,79-5,48	<0,001	6,56	5,09-8,46	<0,001
Estación de nacimiento						
Verano	0,58	0,35-0,95	0,020	1,084	0,95-1,23	0,215
Otoño	1,04	0,67-1,61	0,879	0,78	0,67-0,9	0,001
Invierno	0,64	0,45-0,91	0,014	1,14	1,01-1,28	0,027

Tabla 18. Análisis de regresión logística de la seropositividad individual frente al VMV en relación a diferentes factores de exposición evaluados en la zona de montaña y costa-centro, respectivamente.

OR= Odds Ratio. IC= intervalo de confianza.

Todas las variables estudiadas se asociaron con la seropositividad en los modelos finales de regresión logística ajustado por sus efectos, con la excepción de la variables sexo y número de ovinos incorporados en los últimos cinco años, que carecieron de significación en la zona costa-centro. El mayor Odds Ratio obtenido en la zona de montaña se observó en aquellos rebaños mixtos con alto grado de contacto entre ambas especies (OR = 26,00; IC 95% = 15,21-44,45), mientras que en las zonas de costa-centro el riesgo de infección fue superior en los animales de rebaños grandes (OR = 16,77, IC 95% = 11,46-24,5) y en animales de mayor edad (> 48 meses con un OR = 6,56, IC 95% = 5.09-8.46), en comparación con las categorías de referencia correspondientes. El efecto de la edad fue menor en la zona de montaña que en la zona costa-centro, tal y como se mostró anteriormente en la Figura 15.

Mantener los corderos en un grupo de recría sin salir al pasto antes del destete, en comparación con aquellos que se unen con el rebaño adulto, supone un mayor riesgo de infección por VMV en rebaños de la zona de montaña (OR = 5,73; IC 95% = 2,99-10,99) que en aquellos de la zona costa-centro (OR = 1,38, IC 95% = 1,22-1,57).

El árbol CHAID correspondiente a los animales de la zona de montaña (Figura 16) muestra que la variable con mayor importancia es el contacto ovino-caprino, observándose una seroprevalencia más elevada en los animales de rebaños mixtos con alto contacto entre ambas especies (38,9%). El tamaño del rebaño tiene importancia en estos rebaños mixtos, mientras que en los rebaños formados exclusivamente por ovinos el número de animales incorporados en los últimos cinco años posee mayor importancia. La seroprevalencia más alta se observó en las ovejas pertenecientes a rebaños mixtos con alto contacto y de tamaño medio grande (74,9%). Por el contrario, la seroprevalencia más baja se observó los animales de rebaños de ovinos formados exclusivamente por ovinos o el los mixtos donde existe bajo contacto entre ambas especies y donde el número de incorporaciones en los últimos cinco años fue bajo (1,7%).

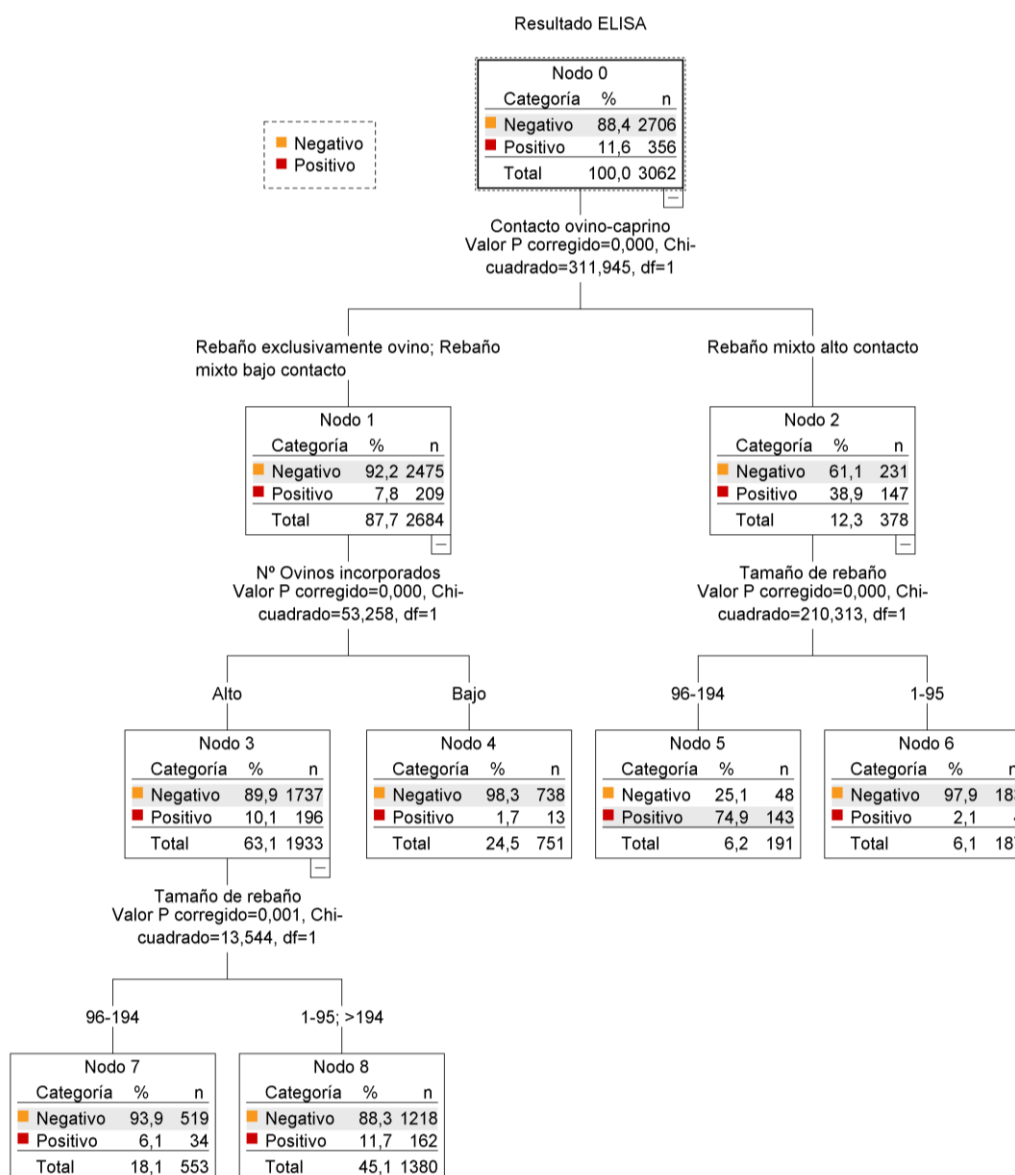


Figura 16. CHAID obtenido al tener en cuenta la seropositividad individual de los ovinos de la zona de montaña.

La primera segmentación obtenida por el algoritmo CHAID para los animales de la zona de costa-centro (Figura 17) fue el tamaño del rebaño. La mayor seroprevalencia de los animales se obtuvo en los rebaños más grandes, de carácter mixto, tanto en animales de 13-48 meses (39,0 y 48,5%) como en mayores de 48 meses (51,1%). Las prevalencias fueron también altas en los animales de rebaños de tamaño medio y mixtos con alto grado de contacto (44,3%), cuando el número de incorporaciones es alto (41%). La seroprevalencia más baja se observó en los animales de rebaños pequeños (2,8%), y en los de rebaños de tamaño medio, cuando el número de ovejas compradas fue reducido (4,3%).

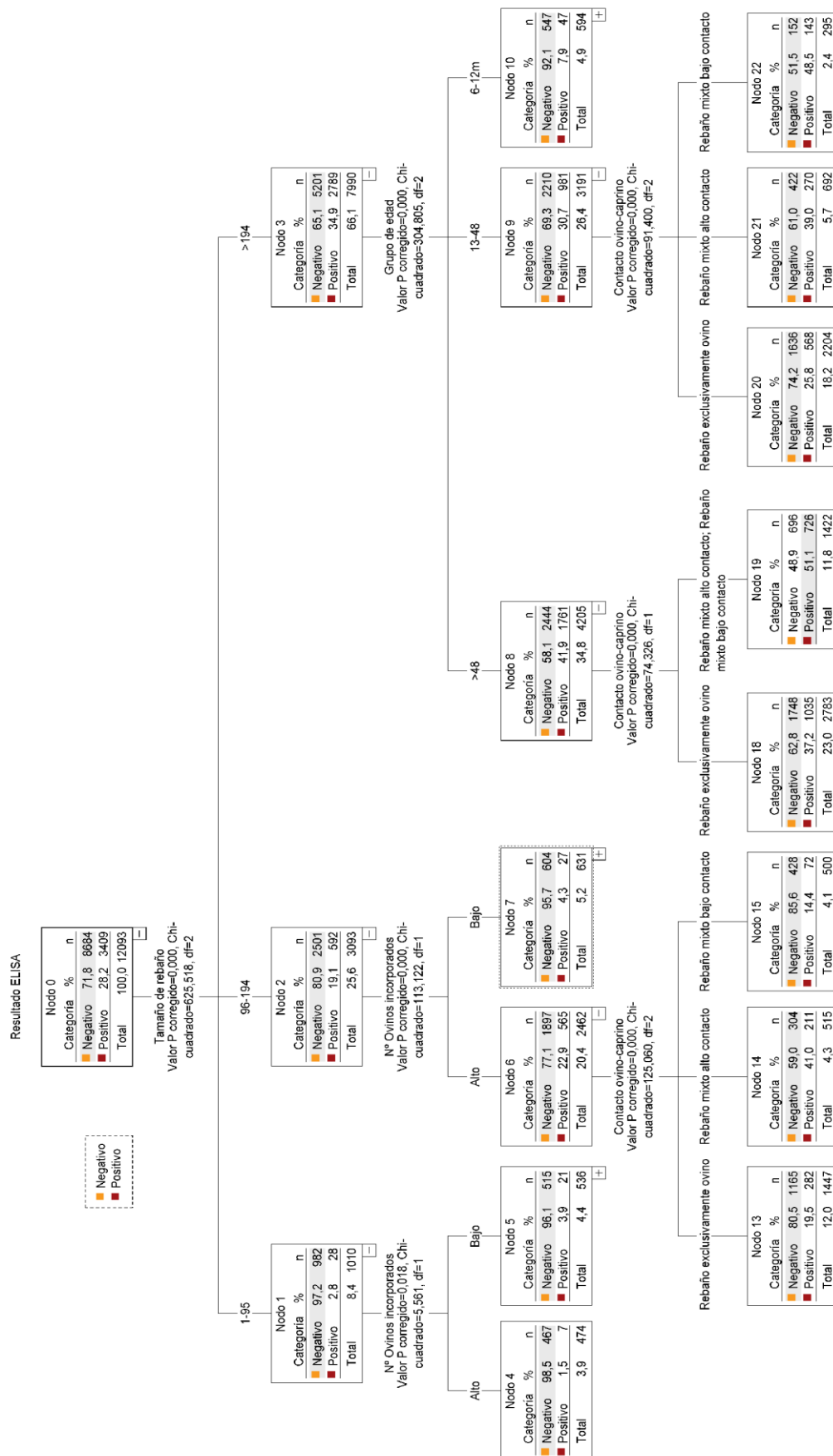


Figura 17. CHAID obtenido al tener en cuenta la seropositividad individual de los ovinos de la zona costa-centro.

4.2. ESTUDIO 2: CÁLCULO INFERIDO DE LA INCIDENCIA DEL MV A PARTIR DE DATOS TRANSVERSALES

Los valores obtenidos en el estudio de la estimación de la incidencia del MV a partir de los datos transversales obtenidos en el ganado ovino semiintensivo de carne de Galicia pueden observarse en la Tabla 19, siendo mayor el riesgo de seroconvertir en aquellos animales menores de cuatro años. En la Figura 18 puede observarse también esta disminución en el riesgo de seroconversión en edades más avanzadas, tanto a nivel general como en las dos áreas geográficas estudiadas al tenerlas en cuenta de modo individual.

Grupo de edad (años)	Total			Montaña			Costa-centro		
	Pos. (%)	Incidencia (%)	95%IC	Pos. (%)	Incidencia (%)	95%IC	Pos. (%)	Incidencia (%)	95%IC
0,5-2	15,92	10,92	0,095-0,117	14,51	9,92	0,061-0,119	16,13	11,07	0,095-0,119
2-4	32,20	10,21	0,091-0,108	21,82	4,37	0,024-0,054	33,96	11,26	0,100-0,120
4-6	37,82	4,23	0,034-0,046	22,78	0,62	0-0,010	40,06	4,73	0,038-0,052
6-8	43,35	4,55	0,035-0,051	22,94	0,10	0-0,003	46,75	5,75	0,044-0,064

Tabla 19. Estimación de la incidencia del VMV según los grupos de edad considerados, a nivel general y según el área geográfica considerada. IC= Intervalo de confianza.

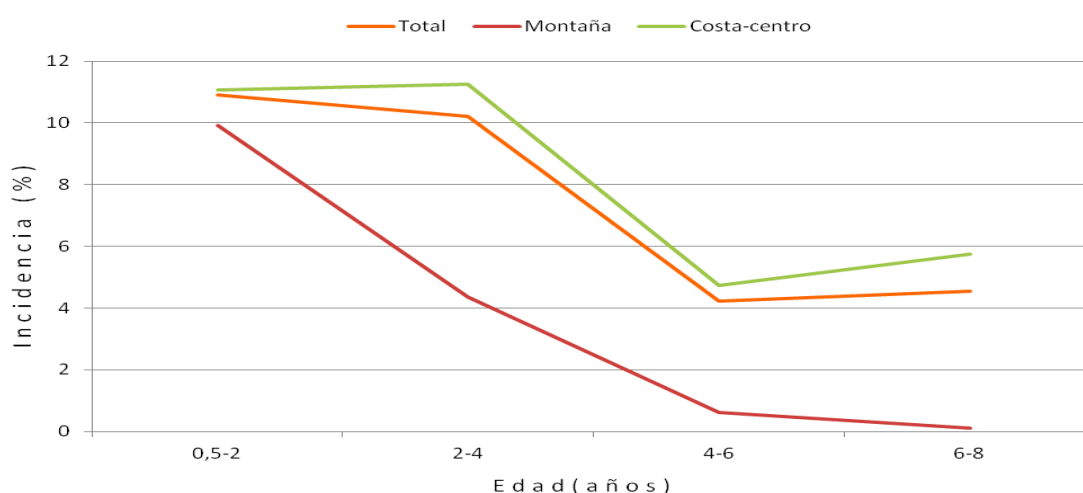


Figura 18. Evolución de la estimación de la incidencia en relación a los grupos de edad considerados, en la totalidad de los datos y según zona geográfica.

Al tener en cuenta la variable contacto ovino-caprino, los resultados obtenidos fueron considerablemente más bajos en el caso de explotaciones formadas exclusivamente por ovinos, mientras que en explotaciones mixtas los valores fueron relativamente próximos (Tabla 20, Figura 19).

Grupo de edad (años)	Rebaño exclusivamente ovino			Mixtos con bajo contacto			Mixtos con alto contacto		
	Pos. (%)	Incidencia (%)	95%IC	Pos. (%)	Incidencia (%)	95%IC	Pos. (%)	Incidencia (%)	95%IC
0,5-2	13,39	9,14	0,075-0,100	16,15	11,08	0,064-0,135	23,72	16,52	0,127-0,185
2-4	27,21	8,32	0,071-0,089	45,23	19,18	0,137-0,220	44,41	14,63	0,117-0,161
4-6	32,66	3,82	0,029-0,043	42,97	-2,04	-	48,95	4,17	0,026-0,050
6-8	38,88	4,73	0,034-0,054	47,68	4,22	0,009-0,059	52,17	3,21	0,015-0,041
8-10	40,22	1,11	0,003-0,015	42,75	-4,61	-	52,84	0,70	0-0,012

Tabla 20. Incidencia Estimada del VMV por grupos de edad al tener en cuenta la variable contacto ovino-caprino.

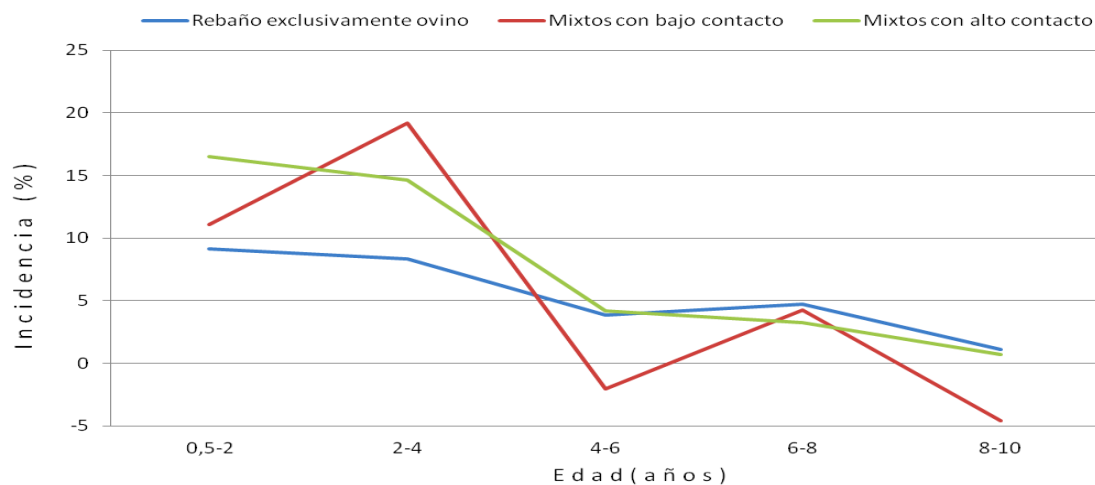


Figura 19. Evolución de la estimación de la incidencia en relación a los distintos grupos de edad considerados en relación a la variable contacto ovino-caprino.

Al tener en cuenta el tipo de alojamiento de los corderos antes del destete, los corderos que se mantienen como un grupo independiente del rebaño adulto hasta el destete presentan un mayor riesgo de seroconversión, el cual aumenta hasta los cuatro años de edad (Tabla 21, Figura 20).

Grupo de edad (años)	Grupo No			Grupo Si		
	Pos. (%)	Incidencia (%)	95%IC	Pos. (%)	Incidencia (%)	95%IC
0,5-2	15,66	10,74	0,092-0,115	17,42	11,98	0,080-0,140
2-4	31,13	9,63	0,085-0,102	39,30	14,27	0,106-0,162
4-6	36,42	3,91	0,031-0,043	47,69	7,17	0,043-0,087
6-8	42,83	5,17	0,040-0,058	47,83	0,13	0-0,004
8-10	42,77	-0,05	-	50,77	2,86	0-0,043

Tabla 21. Incidencia Estimada del VMV por grupos de edad al tener en cuenta la variable tipo de alojamiento de los corderos antes del destete.

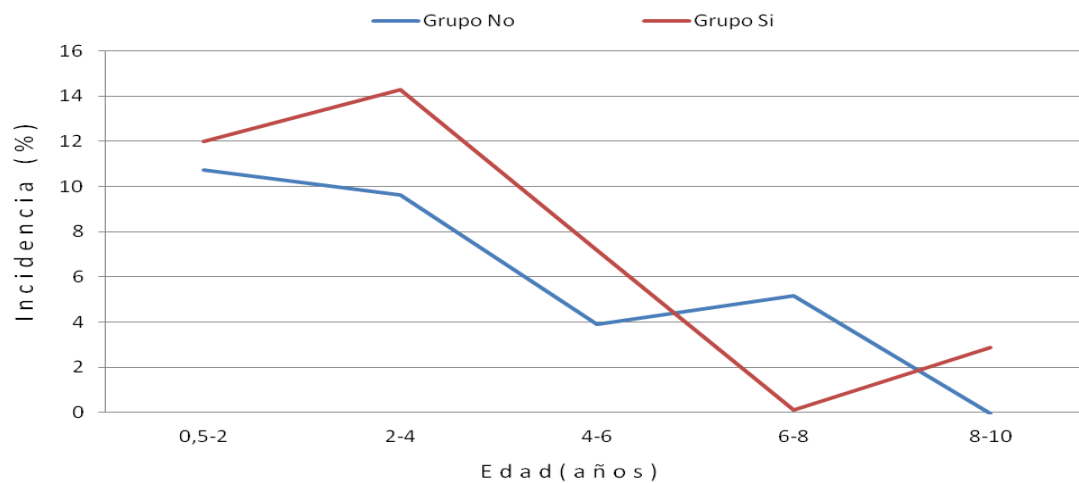


Figura 20. Evolución de la estimación de la incidencia en relación a los distintos grupos de edad considerados en relación a la variable tipo de alojamiento antes del destete.

4.3. ESTUDIO 3: ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE PARÁSITOS BRONCOPULMONARES Y EL MAEDI VISNA

4.3.1. Efecto individual de las parasitaciones broncopulmonares en la población ovina estudiada

Del total de las 2.081 muestras seleccionadas de la población muestral inicial, 394 resultaron seropositivas frente al VMV (18,9%) con la prueba ELISA empleada, 242 presentaron larvas L1 de protostrongídeos (11,6%) y 223 presentaron larvas L1 de *Dyctiocaulus filaria* (10,7%).

Los animales con resultados positivos a la infección por protostrongídeos mostraron una mayor seroprevalencia del VMV (60/242; 24,8%) en comparación con aquellos animales con resultado negativo a la presencia del parásito (334/1839; 18,2%). Al tener en cuenta los resultados en el análisis de Chi-cuadrado, esta diferencia fue estadísticamente significativa, con un valor de $p=0,013$ (Tabla 22). En el caso de la infección por *D. filaria*, las ovejas positivas también mostraron una mayor seroprevalencia del VMV (51/223; 22,9%) en comparación con los que no presentaron el parásito (343/1858; 18,5%), aunque estas diferencias no fueron significativas (Tabla22).

Factor	Chi-cuadrado	OR	95% IC	<i>p</i>
Infección por Protostrongídeos	6,13	1,49	1,06-2,05	0,013*
Infección por <i>D. filaria</i>	2,52	1,31	0,92-1,84	0,112

Tabla 22. Resultados obtenidos en el test Chi-cuadrado al analizar la infección por protostrongídeos y *Dictyocaulus filaria* con la seropositividad frente al VMV. OR= Odds Ratio. IC= intervalo de confianza * Diferencia estadísticamente significativa ($p<0,05$).

4.3.2. Análisis de regresión logística y procedimiento de Mantel-Haentszel

Los resultados obtenidos en el análisis de regresión logística al tener en cuenta los factores descritos como factor de riesgo para la enfermedad del MV en el estudio anterior y la infección por protostrongídeos difieren en relación a la variable edad. Si en el análisis de regresión logística no se incluye dicha variable, la infección por protostrongídeos obtiene un valor p muy próximo a la significación estadística (Tabla 23). Sin embargo, su efecto desaparece cuando la edad se incluye en el modelo (Tabla 24). Al aplicarse un algoritmo de selección "Stepwise" y el criterio de información de Akaike (AIC), todos los factores relacionados con la infección por parásitos broncopulmonares (infección por protostrongídeos y *D. filaria* y recuento larvario) desaparecen del modelo. Esta prueba estadística muestra tanto los valores de Odds Ratios ajustados y la significación de todos los factores e indica claramente que la variable infección por protostrongídeos está actuando como un factor de confusión, en relación con la edad.

	Valor Z	OR	95% IC	p
Tipo de alojamiento de los corderos antes del destete	2,371	1,43	1,06-1,92	0,018*
Tamaño de rebaño				
Pequeño (n=1-95) ^a				
Medio (n=96-194)	7,392	3,77	2,65-5,37	<0,001*
Grande (n>194)	-3,583	0,62	0,48-0,80	<0,001*
Contacto ovino-caprino	4,491	1,50	1,26-1,80	<0,001*
Infección por protostrongídeos	1,932	1,26	0,99-1,59	0,053

Tabla 23. Análisis de regresión logística de la seropositividad del VMV sin incluir la variable edad. OR= Odds Ratio. IC= intervalo de confianza. ^a Categoría de referencia. * Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

		Valor Z	OR	95% IC	p
Tipo de alojamiento de los corderos antes del destete		2,093	1,38	1,02-1,87	0,036*
Edad	6-12 meses ^a				
	13-48 meses	6,750	4,91	3,09-7,80	<0,001*
	>48 meses	-3,479	0,58	0,42-0,79	<0,001*
Tamaño de rebaño	Pequeño (n=1-95) ^a				
	Medio (n=96-194)	7,491	3,88	2,72-5,53	<0,001*
	Grande (n>194)	-4,521	0,65	0,50-0,85	0,001*
Contacto ovino-caprino		4,563	1,83	1,41-2,37	<0,001*
Infección por protostrongídeos		0,905	1,11	0,87-1,42	0,365

Tabla 24. Análisis de regresión logística de la seropositividad al VMV. OR= Odds Ratio. IC= intervalo de confianza. ^a Categoría de referencia. * Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Con el objetivo de demostrar la asociación individual y el efecto de confusión de la variable infección por protostrongídeos, se aplicó la técnica de Mantel-Haenszel (Tabla 25). Los resultados muestran que la infección por protostrongídeos no está relacionada con la seroprevalencia VMV, tanto en el estudio de efectos combinados de Mantel-Haenszel ($\chi^2 = 1,95$; $p = 0,163$) como en el estudio estratificado por edad. Ninguno de los valores de Odds Ratio fueron significativos con respecto a la infección por protostrongídeos (Tabla 25).

		OR	95% IC	p
Edad	6-12 meses	2,48	0,05-20,71	0,371
	13-48 meses	1,21	0,60-2,29	0,512
	>48 meses	1,25	0,84-1,85	0,270
Efectos combinados de Mantel-Haenszel		1,26	0,91-1,73	0,163

Tabla 25. Odds Ratios de la infección por protostrongídeos estratificado por edad en relación a la seroprevalencia del VMV y calculado con el método de Mantel-Haenszel. OR= Odds Ratio. IC= intervalo de confianza.

5. DISCUSIÓN

El presente estudio es el primero en describir la presencia del VMV en ganado ovino de aptitud cárnica explotado en régimen semiintensivo en la Comunidad Autónoma de Galicia, y demuestra que la infección está ampliamente distribuida en el mismo, con seroprevalencias que alcanzan el 52,6% de los rebaños y el 23,3% a nivel individual.

Al comparar nuestros resultados con los descritos en otras regiones españolas observamos que la seroprevalencia individual varía según el sistema productivo considerado, de modo que aumenta cuando lo hace la intensificación de la producción (Leginagoikoa *et al.*, 2010). Así, las seroprevalencias más reducidas se observan en animales procedentes de rebaños extensivos, como las descritas en ovinos de carne de Castilla-La Mancha (5%) (Leginagoikoa *et al.*, 2006b); en explotaciones intensivas, por el contrari, se describen porcentajes más elevados de animales seropositivos, alcanzando el 77% en rebaños de Assaf de Castilla-León (Leginagoikoa *et al.*, 2006b). En ganado ovino explotado en sistemas semiintensivos, las seroprevalencias son muy superiores a las halladas en el presente estudio y se encuentran cercanas al 50%: 55% en el País Vasco (González *et al.*, 1984), 54,4% en Cataluña (Alba *et al.*, 2008) y 52,8% en Aragón (Pérez *et al.*, 2010). En aquellos rebaños donde el VMV está presente de forma endémica, la transmisión del virus, especialmente a través de la vía horizontal, está condicionada por las prácticas de manejo empleadas (Simard y Morley, 1991; Leginagoikoa *et al.*, 2006a) y podría ser la causa de la menor seroprevalencia obtenida en nuestra región en comparación con la señalada en explotaciones semiintensivas de carne y en aquellas más intensivas de ovino de leche. En apoyo de estas diferencias locales, nuestros datos muestran que los ovinos de la zona costa-centro presentan mayor riesgo de infección y seroprevalencia que los de la montaña, lo que probablemente se debe a un período de estabulación más largo. Esta situación se ha asociado positivamente con la infección por el VMV (Leginagoikoa *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2010) y es necesaria para que la transmisión horizontal tenga lugar (Leginagoikoa *et al.*, 2006). Estas diferencias obtenidas según la zona geográfica, refuerzan la importancia de la vía de transmisión horizontal, ya que en ambas zonas las prácticas de manejo empleadas no evitan la vía lactógena. Sin embargo podría haber otros factores que justifiquen esta variación: los porcentajes de seroprevalencia individual aparente del VMV oscilaron entre el 0% y el 74,9% en las distintas explotaciones, con diferencias

notables entre rebaños de una misma zona geográfica. Todo ello indica que incluso dentro de una misma área y empleando un sistema productivo similar, existen otros factores que pueden condicionar de forma considerable la prevalencia de la enfermedad en el rebaño. El estudio de estos factores de riesgo puede aportar información práctica y valiosa para el control de la enfermedad.

La seroprevalencia individual del MV no se vio influida por el **sexo**, coincidiendo con lo señalado previamente por Cutlip *et al.* (1992). Por el contrario, otros autores han observado diferencias al considerar machos y hembras, aunque podrían estar causadas por el diferente manejo al que están sometidos dentro de un rebaño (Simard y Morley, 1991; Ayelet *et al.*, 2001; Arsenault *et al.*, 2003). En Galicia, por el contrario, no se realizan prácticas reproductivas como la sincronización de celos y los machos se mantienen en el rebaño junto a las hembras la mayor parte del año.

Nuestros datos revelan que la seroprevalencia del VMV aumentó significativamente con la **edad de los animales**, desde los 6-12 meses de edad hasta los siete años, tal como se ha descrito también en numerosos estudios (Simard y Morley, 1991; Keen *et al.*, 1997a; Arsenault *et al.*, 2003; Berriatua *et al.*, 2003; Alba *et al.*, 2008). Probablemente, la correlación observada entre la seroprevalencia y la edad no está directamente asociada a un aumento de susceptibilidad fisiológica relacionada con la edad, si no con un incremento de la posibilidad de exposición al VMV mediante la vía horizontal y de la producción de anticuerpos contra el virus con el transcurso de los años (Keen *et al.*, 1997a; Dawson, 1980). Por el contrario, el riesgo de seroconversión se mantiene en niveles elevados hasta los cuatro años de edad para luego disminuir progresivamente hasta los ocho años, donde es prácticamente nula, lo que indicaría una mayor susceptibilidad de los animales más jóvenes. Estos resultados son similares a los obtenidos en un estudio realizado por Berriatua *et al.* (2003), que observaron el máximo riesgo de seroconversión a los 4 años de edad. Leginagoikoa *et al.* (2006a) observaron un patrón similar, si bien en este caso el rango de edad fue más corto: la tasa de seroconversión anual fue elevada durante el primer año de contacto reduciéndose posteriormente hasta ser nula en los animales de cuatro años. Estas diferencias pueden deberse a las diferentes presiones de infección a las que estaban sometidas los rebaños analizados. En el presente estudio, se obtuvo una

seroprevalencia media intra-rebaño del 17,4% mientras que en el estudio realizado por Leginagoikoa *et al.* (2006a) el ganado estaba sometido a una elevada presión de infección, puesto que el 42-66% de los animales de los rebaños eran seropositivos. Aunque hay animales infectados que presentan una seroconversión tardía (Sihvonen, 1980; Houwers *et al.*, 1987; Rimstad *et al.*, 1993), estos resultados sugieren que todas las prácticas de manejo que faciliten la transmisión del VMV en los primeros años de vida, sobre todo en los primeros cuatro años, poseen una notable importancia. El hecho de que la infección experimental con el VMV sea más fácil en animales jóvenes que en adultos (Preziuso *et al.*, 2003) indica una mayor susceptibilidad de éstos a adquirir la infección natural, lo que confirma esta hipótesis. Asimismo, tal como señalan otros trabajos, estas diferencias pueden deberse también a una distinta susceptibilidad individual a la enfermedad. Berriatua *et al.* (2003) y Leginagoikoa *et al.* (2006a) observaron una menor seroprevalencia en los corderos descendientes de aquellos animales seronegativos mayores de cuatro años, demostrando que los animales susceptibles se infectan en edades tempranas. En nuestro estudio, la relación entre la seroprevalencia y la edad varió según la zona geográfica. En la zona costa-centro, la seroprevalencia de las ovejas se incrementó gradualmente hasta 7 años de edad, para luego mantenerse en valores constantes. Este comportamiento es similar al descrito en otras explotaciones semiintensivas de carne (Simard y Morley, 1991), mientras que en rebaños intensivos lecheros la seroprevalencia alcanza su máximo valor en animales de 4-5 años, descendiendo ligeramente en edades posteriores (Leginagoikoa *et al.*, 2006a). Las diferencias en la relación seroprevalencia-edad observadas entre los rebaños de la zona costa-centro y los rebaños intensivos lecheros en el resto de España podrían tener su origen en una menor tasa de desvieje o a que, en nuestro caso, se desconocía el estado sanitario frente a la enfermedad antes de la realización del estudio, de manera que la seropositividad a MV no se utilizó como criterio a la hora de mantener, vender o sacrificar animales. Por estas razones, los animales infectados podrían permanecer más tiempo en la explotación, lo que explicaría el aumento de la seroprevalencia hasta los 7 años de edad y su mantenimiento posterior. En la zona de montaña, donde la eficacia de la transmisión horizontal se mostró menos eficaz, la seroprevalencia aumentó con la edad, aunque en menor medida que en la zona costa-centro, y se mantuvo por debajo del 15% en casi

todos los grupos de edad. Al tener en cuenta los datos obtenidos en el riesgo de infección, los resultados difieren sustancialmente en las dos áreas geográficas consideradas. En la zona costa-centro el comportamiento es el descrito anteriormente, con un riesgo de infección que aumenta hasta los cuatro años para luego disminuir progresivamente. Sin embargo, en la zona de montaña, el riesgo de infección disminuye progresivamente tras presentar su máximo a los seis meses de edad. Estos resultados reforzarían el papel de la transmisión horizontal como principal fuente de infección de los animales y sobretodo en edades tempranas. En ambas zonas los animales se amamantan de forma natural, de modo que la transmisión lactógena no se evitó. Sin embargo, el manejo que presentan los rebaños de la zona de montaña, con menores periodos de estabulación, favorece menos la transmisión horizontal, haciéndose patente en los valores de riesgo de los animales jóvenes, que decrecen acusadamente desde el punto de inicio. Estos resultados sugieren a la necesidad de realizar mayores estudios al respecto para determinar si, en condiciones de campo, los animales jóvenes son más susceptibles que los animales adultos.

Los resultados obtenidos demuestran que existe una correlación positiva entre el **tamaño de rebaño** y la seroprevalencia, tanto individual como a nivel de rebaño. Se podría pensar que en rebaños más grandes existe un incremento de la transmisión horizontal del VMV por las secreciones respiratorias debido a una mayor densidad de los animales o incluso por un mayor confinamiento de los mismos (Berriatua *et al.*, 2003). Sin embargo, Pérez *et al.* (2010) apreciaron esta correlación aun teniendo en cuenta el número de días de estabulación y el grado de ventilación. Por tanto, las variaciones asociadas con el tamaño podrían estar relacionadas con factores de manejo no investigados en este estudio, como la alimentación de los animales, las condiciones de alojamiento o las estrategias de desvieje y sacrificio llevadas a cabo en los rebaños de gran tamaño. Simard y Morley (1991) también apreciaron que los rebaños de gran tamaño suelen pertenecer a explotaciones que llevan un mayor tiempo en funcionamiento, lo que posibilita una mayor exposición a la transmisión horizontal de la enfermedad y aumenta la probabilidad de introducción del virus.

En este estudio se apreció que el **número de animales comprados** en los últimos cinco años se incrementó con el tamaño del rebaño, aunque cada uno de estos

factores se asoció significativamente de forma positiva con la seropositividad a nivel de rebaño en el análisis multivariable. Al analizar ambas áreas geográficas de forma separada se apreció que únicamente en rebaños puros o mixtos con bajo contacto entre ambas especies pertenecientes a la zona montañosa y en aquellos de tamaño pequeño y medio de la zona costa-centro existía una asociación estadísticamente significativa entre la entrada de animales en los últimos años y la seroprevalencia individual. Esto es un punto importante a tener en cuenta, ya que en estas granjas la seroprevalencia de la enfermedad es baja y la entrada de animales infectados puede provocar un efecto importante sobre la misma. Sin embargo, la entrada de animales no influye en la prevalencia individual en aquellos rebaños donde ésta ya es alta. Aunque varios autores han señalado que el comercio de ovejas entre diferentes países juega un papel importante en la difusión de la enfermedad (Blacklaws *et al.*, 2004; Petherhans *et al.*, 2004), existe poca información sobre el efecto del movimiento de animales vivos entre distintas explotaciones. Los resultados de este trabajo, junto con la ausencia de una regulación específica del MV en el comercio nacional e internacional y de un programa de vigilancia y control de la enfermedad en muchos rebaños, debido a su carácter voluntario, sugieren que el movimiento de animales vivos puede contribuir a la difusión del VMV e influir sobre todo en la seroprevalencia a nivel de rebaño y en la individual en las granjas donde ésta es baja. En este sentido se ha señalado que para evitar la introducción de la enfermedad en una granja o disminuir su prevalencia, se deben introducir animales de rebaños acreditados como libres de VMV (Christodouloupoulos, 2006). Sin embargo estas medidas no se pueden llevar a la práctica con facilidad, ya que la mayoría de los rebaños seronegativos son de pequeño tamaño, lo que dificulta su empleo como fuente de cría para las explotaciones seropositivas.

Uno de los resultados novedosos de este estudio ha sido identificar el **contacto con ganado caprino** como un importante factor de riesgo para la infección con VMV, a pesar del bajo número de cabras en los rebaños mixtos. Durante décadas se consideró que el MV era exclusivo de ovejas, aunque recientes estudios filogenéticos han puesto de manifiesto que el mismo subtipo de LVPR puede afectar a ovejas y cabras en rebaños mixtos; por lo tanto, los LVPR pueden, de forma natural, saltar la barrera

interespecie en ambas direcciones tanto a través de la vía horizontal como de la lactógena en animales adultos (Leroux *et al.*, 1997; b *et al.*, 2004; Pisoni *et al.*, 2005; Gjerset *et al.*, 2007). A pesar de ello, los trabajos publicados no aportan información sobre el papel real de los caprinos en la prevalencia del MV en los rebaños ovinos. Hay autores que defienden que aunque existe el riesgo potencial, la transmisión del VMV entre ovejas y cabras sólo ocurre en raras ocasiones (Brülisauer *et al.*, 2005). Solamente Alba *et al.* (2008) tuvieron en cuenta el posible efecto de la presencia de cabras en explotaciones de ovino; los resultados obtenidos mostraron que el número de rebaños seropositivos era superior cuando la granja contaba con cabras en comparación con explotaciones puras de ovinos. Sin embargo, estos autores no analizaron el posible impacto que la presencia de los caprinos puede ejercer sobre la seroprevalencia individual. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo revelan, además, que un elevado grado de contacto entre cabras y ovejas en el rebaño se asocia con mayores niveles de seroprevalencia individual en ovejas, incluso si el número de cabras presentes en los rebaños es reducido. Todo ello sugiere que la transmisión interespecie es más frecuente de lo que previamente se consideraba.

Se ha señalado que la transmisión de cabras a ovejas y viceversa puede tener lugar tanto por vía horizontal como lactogénica. Los resultados de este estudio indican que la importancia relativa de ambas vías en la transmisión interespecie podría variar según las condiciones de producción. Nuestros datos muestran que el contacto entre las dos especies parece tener más influencia sobre la seroprevalencia en los rebaños de la zona montañosa, es decir, donde la transmisión horizontal es relativamente menos importante debido a su sistema de producción. Esto podría indicar una mayor importancia relativa de la vía lactógena en la transmisión de cabras a ovejas. Sin embargo, en la zona costa-centro, se identificó una interacción entre el tamaño de los rebaños y el contacto entre ambas especies. Así, en los rebaños de gran tamaño, la sola presencia de caprinos en la explotación se asoció con una mayor seroprevalencia individual en aquellos animales mayores de 48 meses, mientras que en las explotaciones de tamaño medio fue necesario un contacto mayor entre ambas especies, es decir, encontrarse plenamente integrados con el rebaño ovino. Por lo tanto, en explotaciones más intensivas, las mayores seroprevalencias pueden estar

relacionadas con una mayor facilidad de transmisión por vía horizontal. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de realizar estudios adicionales para esclarecer el papel epidemiológico de las cabras como transmisoras del virus así como sobre la importancia relativa de las vías de transmisión. Debido al tipo de estudio realizado no se pudo determinar cuál de las dos vías principales de transmisión del VMV es la dominante en la transmisión entre ambas especies, resaltando la necesidad de realizar nuevos estudios basados en biología molecular que permitan establecer la dinámica de la infección entre ambas especies. Esto permitirá establecer medidas de control de gran trascendencia dado que la presencia de cabras en los rebaños de ovejas es una práctica muy común en las granjas de ovino de carne de España. Aún así, podemos concluir que la presencia de caprinos constituye un factor de riesgo real en la transmisión del MV y que, por lo tanto, deberían tenerse en cuenta a la hora de implementar un programa de prevención y control de la enfermedad, como ya fue propuesto por otros autores (Pisoni *et al.*, 2005).

Keen *et al.* (1997a) señalan que todas aquellas **prácticas de manejo** que incrementen la exposición al virus durante el periodo predestete, favorecerán el aumento de la seroprevalencia de VMV. De acuerdo con nuestros resultados la concentración estacional de los partos no puede considerarse como un factor de riesgo, al no obtenerse una asociación entre la seroprevalencia y la estación con mayor número de partos. Esto coincide con el estudio realizado por Berriatua *et al.* (2003), donde la seroconversión no se asoció ni con el mes de nacimiento ni con el contacto entre la madre y el recién nacido. En nuestro estudio los animales no pasaban más de siete días con sus madres, lo cual puede representar un periodo de tiempo pequeño en relación al total del periodo predestete. A pesar de que se observaron diferencias significativas en la seroprevalencia de VMV según este factor cuando se analizaron las dos áreas geográficas por separado, en algunos casos éstas no fueron tan importantes como las obtenidas por otros factores, como el alojamiento durante el periodo predestete. Además, los valores más elevados de seroprevalencia no siempre coincidieron con la época de mayor concentración de partos, lo que implica que las diferencias en la seroprevalencia son debidas a otros factores relacionados con la paridera y no tenidos en cuenta en este estudio. Estos resultados contrastan sin

embargo con los obtenidos al tener en cuenta el **periodo predestete** (2-3 meses); el aumento del contacto entre los corderos en este periodo es más importante que los días en que permanecen con sus madres después del parto. Varios autores han resaltado la importancia de la vía horizontal sobre la vía lactógena en la transmisión del VMV (Radostits *et al.*, 2000; Leginagoikoa *et al.*, 2006b), de ahí que la mayoría de los estudios se hayan centrado en la transmisión del virus durante las primeras 24 horas de vida (Álvarez *et al.*, 2006) o entre animales adultos (Leginagoikoa *et al.*, 2006a). Sin embargo, la información disponible sobre la importancia de la transmisión horizontal desde el nacimiento hasta el destete es insuficiente, siendo uno de los periodos donde existen mayores diferencias de manejo entre las explotaciones. Asimismo, existen pocos trabajos que hayan estudiado la posibilidad de una transmisión horizontal eficiente entre corderos, sugiriendo que se produce en los primeros meses de vida, coincidiendo con una primera fase virémica típica de los lentivirus (Coffin, 1996a; Álvarez *et al.*, 2006). Al comparar los dos tipos de manejo de la cría más comunes en las explotaciones semiintensivas de ovino de carne de Galicia, se observó que mantener a los corderos alojados en estabulación permanente, de forma conjunta y separados del resto del rebaño durante el periodo predestete actúa como un factor de riesgo para la infección por VMV, ya que facilita la transmisión horizontal del virus entre los animales. Asimismo, en estos animales el riesgo de infección aumenta acusadamente hasta los cuatro años de edad, siendo mayor que en los corderos que se incorporan al resto del rebaño, cuyo riesgo de infección disminuye paulatinamente con la edad. Por ello, sería recomendable que esta práctica de manejo se revise en las granjas de ovino. Este mayor riesgo podría deberse a que los corderos se encuentran estabulados de forma permanente en un microclima relativamente menos ventilado y con una elevada densidad animal, en comparación con aquellos que se integran con el resto del rebaño. En estas condiciones la transmisión horizontal de la enfermedad es mucho más eficiente, de modo que los corderos infectados de forma temprana, a través de la vía lactógena o del contacto estrecho con su madre durante los primeros días de vida, tienen más posibilidades de actuar como fuente de infección para el resto de los corderos. Sin embargo, no existen estudios que constaten este hecho. Asimismo, este factor de riesgo parece tener una mayor importancia relativa sobre la prevalencia cuando, en

etapas posteriores, los animales presentan un confinamiento menor, como ocurre en los rebaños semiintensivos o extensivos; esto parece confirmarse por el hecho de que la asociación entre el alojamiento de los corderos predestete y la seroprevalencia de las ovejas fue mucho mayor en la zona montañosa que en la zona costa-centro. Estos resultados podrían estar relacionados con los obtenidos en un estudio reciente llevado a cabo en explotaciones de ovino de carne, donde se mostró una asociación negativa entre la seroprevalencia y la edad al destete (Pérez *et al.*, 2010). Los autores propusieron que una larga y estrecha relación de la madre con los corderos podría tener un efecto protector de la infección, aun cuando estos animales presentan una mayor exposición al VMV vía lactógena. Sin embargo, esto también podría ser explicado debido a que la realización de un destete prematuro es un manejo típico de rebaños intensivos, donde los corderos, cuando son separados de sus madres, son estabulados casi de forma permanente en lotes de cría, favoreciéndose tal como hemos mencionado, la transmisión horizontal del VMV entre los mismos.

Los resultados de este estudio muestran que la seroprevalencia del VMV fue mayor en ovejas infectadas con **nematodos protostrongílidos** que en aquellas no parasitadas. Las bronconeumonías verminosas, a pesar de la profilaxis antiparasitaria realizada, siguen teniendo elevada relevancia en nuestra comunidad. Cienfuegos *et al.* (2007) evaluaron el estado epidemiológico de las nematodosis pulmonares en 29 explotaciones de ovino de producción cárnica de Galicia, comprobando que la prevalencia a nivel de rebaño era del 75% y el 64,5% de las explotaciones presentaba algún animal infectado con protostrongílidos. Asimismo, la prevalencia individual fue del 27,3%; se hallaron larvas de primer estadio de protostrongílidos en el 19,5% de los animales estudiados, siendo *Muellerius capillaris* el género más común. Díez-Baños *et al.* (1989, 1994), Martínez *et al.* (1989), Martínez (1992) y Morondo *et al.* (1992) comprobaron que en la provincia de A Coruña, la especie más abundante era *Neostrongylus linearis*, seguido por *Cystocaulus ocreatus* y *M. capillaris*. En la provincia de Lugo, Martínez *et al.* (1989) encontraron mayores porcentajes de infección por *M. capillaris* (49,1%) que por *N. linearis* (44,7%) y *C. ocreatus* (6,2%). Estudios más recientes realizados en la provincia de Lugo señalan un predominio más notable de la infección por *M. capillaris* (Díez-Baños *et al.*, 1994; Martínez, 1992). Al analizar

conjuntamente la seroprevalencia del VMV y la parasitación por parásitos broncopulmonares, la relación entre estas dos variables fue estadísticamente significativa al realizar el estudio univariable, coincidiendo con otros autores (Giangaspero *et al.*, 1993). Sin embargo, De Boer *et al.* (1979) no encontraron evidencias de la influencia de *M. capillaris* en la infección del VMV y Mornex *et al.* (1994), al analizar pulmones de ovejas infectadas por el VMV, observaron que no presentaban lesiones causadas por protostrongílidos.

La regresión logística nos ha permitido arrojar cierta luz en la posible relación entre el VMV y los parásitos pulmonares, al detectar un posible efecto confusor en las variables estudiadas. La posible relación existente entre la seropositividad y la infección causada por los protostrongílidos desaparece cuando la edad del animal es introducida como variable. La prevalencia por protostrongílidos está relacionada de forma positiva con la edad de los animales (Cabaret *et al.*, 1978; Alemu *et al.*, 2006; Regassa *et al.*, 2010; López *et al.*, 2011) de modo que los mayores porcentajes de infección se observan en los animales más viejos; en Galicia se ha demostrado que la infección por *M. capillaris* tiende a ser acumulativa a lo largo del tiempo (López *et al.*, 2011). Asimismo, el MV es también una enfermedad crónica, relacionándose en numerosos estudios la seroprevalencia de la enfermedad con la edad de los animales (Simard y Morley, 1991; Arsenault *et al.*, 2003). Al asociarse las dos infecciones de carácter crónico con la edad de los animales, se genera una relación positiva artificial detectada por el análisis estadístico individual, pero descartada al emplear técnicas estadísticas multivariadas, donde la infección por protostrongílidos aparece como un factor confusor en la seropositividad del VMV. Sin embargo, esta conclusión contrasta con Straub (2004), que afirma que los tratamientos profilácticos regulares con antihelmínticos reducen el riesgo de transmisión del VMV, debido a que las parasitaciones pulmonares favorecen la dispersión del virus. Los resultados obtenidos por Straub, al unificarse con los resultados obtenidos en este estudio, podrían deberse a infecciones causadas por otros parásitos más que a infecciones por nematodos broncopulmonares. Se ha demostrado que las infecciones primarias combinadas de nematodos gastrointestinales (GI) (*Ostertagia ostertagi* + *Cooperia oncophora*) provocan un aumento en el establecimiento de infecciones broncopulmonares.

(*Dictyocaulus viviparus*) en terneros (Kloosterman *et al.*, 1989, 1990), ya que una elevada carga parasitaria de GI podría provocar en estos casos una baja inmunidad contra las infecciones por nematodos broncopulmonares (Armour *et al.*, 1987). Los nematodos GI presentan un amplio espectro de mecanismos inmunoreguladores que modifican la respuesta inmunitaria del hospedador en su beneficio, incapacitando de este modo la respuesta generada (Else, 2005) y favoreciendo, como efecto secundario, la presencia de otros agentes infecciosos. Los GI son parásitos muy comunes en los rebaños que formaron parte de este estudio, puesto que la prevalencia fue del 64,5%. Su presencia y la intensidad de eliminación, expresada como el número de huevos por gramo de heces, se incluyeron de forma adicional como posibles factores de riesgo, sin observarse relación con la seroprevalencia por VMV mediante el análisis de regresión logística (datos no mostrados). Sin embargo, las especies de nematodos GI no fueron identificadas por coprocultivo, por lo que el tipo de infección (simple o combinada) no pudo incluirse como factor en el análisis estadístico. Los resultados obtenidos resaltan la necesidad de llevar a cabo nuevos estudios centrados en definir correctamente el efecto que las parasitaciones del ganado ovino, muy frecuentes en los sistemas que incluyan pastoreo, puede estar ejerciendo sobre los niveles de seropositividad del VMV.

Por otra parte, el efecto de los tratamientos antihelmínticos sobre la seropositividad del VMV podrían ser también explicados por la inmunoestimulación causada por principios activos como el levamisol (Lanusse *et al.*, 2009). Se ha detectado un efecto inmunoestimulante no específico en diferentes especies de mamíferos tratados con levamisol, como ocurre en el caso de terneros neonatos (Mohri *et al.*, 2005). En el estudio de Straub (2004) no consta si el levamisol fue empleado como principio activo en los tratamientos antihelmínticos. En el caso de que así fuera, una inmunoestimulación causada directamente por el fármaco podría considerarse dentro de la variable “tratamiento antihelmíntico”. Esta variable no fue incluida en este estudio como factor de riesgo ya que todos los rebaños eran sistemáticamente desparasitados en verano y/o otoño, no existiendo un grupo control con el que poder comparar los resultados. Por otra parte, los antiparasitarios más empleados en el ganado ovino gallego fueron los bencimidazoles o su combinación con

alguna lactona macrocíclica, mientras que el levamisol apenas se usa en esta región (Pedreira *et al.*, 2006; López *et al.*, 2011).

En un reciente estudio realizado por la Organización Común de los Mercados Agrícolas de la Comisión Europea (DG AGRI, 2012) se pone de manifiesto la frágil situación en la que se encuentra el sector ovino en los países miembros, entre los que destaca España, donde el número de cabezas ha disminuido drásticamente desde el 2007 hasta la actualidad. Otra de las razones de la evolución negativa del sector es el elevado coste de la alimentación registrado sobre todo en los países miembros del Sur de Europa. La mayor parte de los rebaños de ovino de carne de nuestro país se basan en un sistema de producción tradicional semiintensivo, basado en el aprovechamiento de recursos forrajeros durante todo el año. La importancia del sector en España no es solo económica, sino que también contribuye a mantener el medio rural en buenas condiciones agroambientales a través de su fuerte vínculo con el territorio y favoreciendo el asentamiento de la población rural. Por lo tanto, teniendo en cuenta las características del sector y la situación en la que se encuentra en la actualidad, se hace necesario incrementar la rentabilidad de las explotaciones, objetivo que lleva implícito un control de todas aquellas enfermedades que puedan causar pérdidas económicas, valoradas a través de los parámetros productivos y reproductivos de las explotaciones. Como hemos comentado anteriormente, en las explotaciones de ovino, tanto de aptitud cárnica como láctea, el MV puede ser una causa importante de pérdidas económicas, que pueden quedar enmascaradas por el carácter crónico y generalmente asintomático de la enfermedad y pasando generalmente inadvertidas para los propietarios. Es por lo tanto de gran importancia determinar la situación de las explotaciones de ovino ante la infección por el VMV y proponer un **programa de control y erradicación de la enfermedad** con el objetivo de hacer factible la viabilidad de las explotaciones, ya que si tenemos en cuenta los resultados obtenidos en este estudio, la enfermedad está ampliamente distribuida en las explotaciones de ovino de carne de Galicia y además las explotaciones con seroprevalencia media-alta al MV (7%) eran las de mayor tamaño y, por tanto las de mayores expectativas comerciales y profesionales. A la hora de implantar un programa de control del MV debe tenerse en cuenta la estructura de los rebaños y el carácter práctico de las medidas aconsejadas,

ya que con frecuencia éstas son difíciles de aplicar en determinados tipos de rebaños. En aquellas explotaciones de ovino de carne en los que no se haya detectado animales seropositivos a la enfermedad, como en 38 de los rebaños estudiados, es necesario mantener el estatus negativo del mismo, evitando la entrada de animales infectados. Estas explotaciones podrían actuar como fuente de recría de aquellas explotaciones positivas, hecho que se ve dificultado por el pequeño tamaño que, en general, presentan. En aquellas explotaciones con baja prevalencia (<25%) y con media y alta prevalencia (>25%), que representan aproximadamente el 18% y 35% de las explotaciones estudiadas, respectivamente, la compra de animales de rebaños seronegativos puede ser difícil por la problemática recién expuesta. En caso de no ser posible, se recomienda la compra de animales seronegativos procedentes de rebaños con menores seroprevalencias en comparación con la de destino, ya que al ser menor la presión de infección, también lo es el riesgo de infección. Ante esta situación sería de gran utilidad que las ADS introdujeran el MV dentro de los programas de control a fin de conocer el estado sanitario del ganado frente a esta enfermedad y poder elaborar de este modo una lista de carácter público, dando a conocer aquellas explotaciones libres de la misma o con baja seroprevalencia. De este modo no solo estas explotaciones tendrían un valor añadido al ser certificadas como libres, sino que se le facilitaría la adquisición de recría negativa a los ganaderos interesados. Asimismo, en los rebaños de baja seroprevalencia, sería recomendable la eliminación de aquellos animales positivos a la prueba diagnóstica, acompañado de análisis serológicos periódicos al resto de los efectivos. Esta medida es económicamente poco viable en las explotaciones de media y alta prevalencia, las cuales representan más del 30% de las explotaciones estudiadas. En estos casos las medidas a adoptar son limitadas en el ovino de carne. Una de las medidas descritas en la literatura es la creación de dos rebaños según la seropositividad de los animales, práctica demasiado laboriosa y que requiere de instalaciones adicionales para mantener al segundo rebaño. La cría de los corderos con calostro artificial para reducir el contagio de la reposición es una medida relativamente viable en ovino de leche, pero complicada de llevar a cabo en ovino de carne, no solo por el esfuerzo que se requiere por parte del ganadero, sino también por los problemas que se le podrían causar a las madres al no realizarse ordeño. Además esta estrategia de control se ha descrito como poco útil si no se complementa

con la prevención de la transmisión horizontal (Berriatua *et al.*, 2003; Álvarez *et al.*, 2005). Por lo tanto, la medida más práctica en estos casos sería la recría a partir de hijas de seronegativas, preferiblemente aquellas mayores de cuatro años, tal como sugieren nuestros resultados y los obtenidos en trabajos previos (Berriatua *et al.*, 2003; Leginagoikoa *et al.*, 2010), así como el desvieje selectivo de aquellos animales seropositivos. En explotaciones de seroprevalencia media-baja se ha visto que es una técnica efectiva que permite reducir la prevalencia considerablemente, ya que la tasa de incidencia de infección es similar o inferior a la tasa de desvieje (Berriatua *et al.*, 2003). Sin embargo, en aquellas explotaciones de prevalencia alta nos encontramos ante una situación complicada, puesto que no se dispone de animales seronegativos suficientes de los que criar, hecho que se ve agravado por el pequeño tamaño de las explotaciones libres que puedan vender sus efectivos a este tipo de explotaciones. En estos casos, y a la vista de nuestros resultados, se recomienda la creación de dos grupos teniendo en cuenta el estatus serológico de la madre, o en su defecto, la inclusión de los corderos con el rebaño adulto, puesto que se ha observado que el mantener a todos los corderos juntos en un grupo de cría es un factor de riesgo para la enfermedad del MV. Además, puesto que se ha determinado que los caprinos suponen a la vez un factor de riesgo de la enfermedad, se recomienda o bien su eliminación del rebaño ovino, o bien su separación física dentro del rebaño, evitando su contacto. Con estas medidas descritas podríamos estar ayudando a disminuir la prevalencia de la enfermedad en este tipo de explotaciones de elevada seroprevalencia, que en la actualidad tienen grandes dificultades prácticas para desarrollar medidas de control de la enfermedad económicamente viables, y que en nuestro caso, son las de mayor tamaño y por lo tanto, con mayores expectativas comerciales y profesionales.

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo llegamos a las siguientes **CONCLUSIONES:**

En relación a la **SITUACIÓN DEL MAEDI VISNA EN GALICIA:**

- 1ª. La infección por el virus del Maedi Visna está ampliamente distribuida en las explotaciones profesionales de ovino de carne de Galicia puesto que la seroprevalencia es elevada tanto a nivel individual (23,3%) como a nivel de rebaño (52,6%).

En relación a los **FACTORES DE RIESGO:**

- 2ª. El aumento de la seroprevalencia del MV con la edad no está relacionado con una mayor susceptibilidad en edades adultas, observándose por el contrario un aumento del riesgo de infección hasta los cuatro años de edad. Las diferencias observadas en relación a la seroprevalencia según la edad en las dos áreas geográficas consideradas reafirman la importancia de la transmisión horizontal dado que en ninguna de ellas las explotaciones tomaban medidas para evitar la transmisión lactogénica.
- 3ª. El manejo durante el periodo predestete influye considerablemente en la seroprevalencia individual del Maedi Visna; durante este periodo, los corderos estabulados permanentemente en un grupo separado del resto de animales presentaron mayor riesgo de infección, y por tanto mayores seroprevalencias, que los que se introducían directamente en el rebaño adulto tras un período de pocos días con sus madres en las parideras separados del rebaño. Este hecho demuestra que las prácticas de manejo que facilitan la transmisión horizontal en el periodo predestete se traducen en mayores seroprevalencias en las explotaciones. Asimismo, se necesitan más estudios para investigar la capacidad de los corderos para eliminar el virus durante los primeros meses de vida, así como su susceptibilidad en relación con los animales adultos.
- 4ª. La presencia de cabras en las explotaciones de ovino de carne es un factor de riesgo para la infección por el virus Maedi Visna, incluso cuando el número de

cabras es reducido. Este hecho se debe tener en cuenta en los programas de prevención y control de esta enfermedad y muestra la necesidad de esclarecer la importancia relativa de las vías de transmisión entre ambas especies.

- 5ª. En explotaciones donde no existe un manejo diferente entre machos y hembras, el sexo no influye en la prevalencia del MV. Asimismo, no existe relación entre la seropositividad al VMV y la infección por nematodos broncopulmonares, que en este caso actúa como variable confusora. Además, se necesitan nuevos estudios para definir correctamente el efecto que las infecciones por diferentes parásitos puedan ejercer sobre la seroprevalencia por VMV.
- 6ª. El movimiento de animales sin control previo provoca un aumento de las explotaciones con animales seropositivos a VM, así como un aumento de la prevalencia en las explotaciones donde ésta es baja.

En relación al **PROGRAMA DE CONTROL en ganado ovino de carne:**

- 7ª. Los resultados obtenidos y especialmente la alta prevalencia de los rebaños de mayor tamaño, hacen patente la necesidad de implementar un programa de control y vigilancia con el objetivo de reducir la prevalencia de la enfermedad y, por tanto, las pérdidas económicas que el MV puede estar causando.
- 8ª. Es recomendable, especialmente en explotaciones con ausencia de animales seropositivos, evitar la entrada de animales infectados, impulsando la cría propia o comprando ovinos únicamente de explotaciones libres de la enfermedad. Si estas recomendaciones no pueden llevarse a cabo, se aconseja la compra de animales de cría de aquellas explotaciones con menor seroprevalencia al virus del Maedi Visna que la explotación de destino. Todo ello pone de manifiesto la necesidad de que las AD SG establezcan un listado de explotaciones negativas o de baja seroprevalencia a fin de facilitar la compra de animales en aquellas explotaciones que así lo requieran.

- 9ª. Se aconseja la incorporación de los corderos de recría con el rebaño adulto antes del destete o la creación de dos grupos según el estatus serológico de la madre. En el segundo caso, serán empleados para reposición aquellos corderos nacidos de madres seronegativas, sobretodo de aquellas madres mayores de cuatro años de edad.
- 10ª. Se recomienda la separación física y efectiva del ganado caprino o su eliminación de la explotación, con el fin de reducir la prevalencia del VMV.
- 11ª. La eliminación de animales seropositivos solamente puede realizarse sistemáticamente en explotaciones con baja prevalencia (18%). En el caso de explotaciones con media o alta prevalencia (33,3%), se realizará desvieje prematuro de animales seropositivos.

7. RESUMEN-SUMMARY

RESUMEN

El sector ovino se encuentra en la actualidad en una frágil situación, no solo en España, sino en la mayoría de los países miembros de la Unión Europea (DG AGRI, 2012), con un descenso drástico en el número de cabezas en los últimos cinco años y un incremento en los costes de alimentación. Por todo ello es necesario incrementar la rentabilidad de las explotaciones, objetivo que lleva implícito un control de todas aquellas enfermedades que puedan causar pérdidas económicas. El Maedi Visna (MV) es un proceso que causa notables mermas en la producción, aunque debido a su curso crónico y, generalmente, asintomático, sus efectos negativos suelen pasar inadvertidos para los propietarios. Asimismo, al tratarse de una enfermedad para la cual no existe tratamiento efectivo ni vacunas, la única herramienta viable para controlar y disminuir la infección dentro de un rebaño es el desarrollo y aplicación de programas de control adecuados basándose en el comportamiento epidemiológico de la enfermedad.

Las rutas más importantes de transmisión del MV son la lactógena, a través del calostro y la leche (Pritchard y Dawson, 2000) y la vía horizontal por contacto directo o indirecto con secreciones respiratorias; de este modo los ovinos de todas las edades son susceptibles de infectarse con el virus (Berriatua *et al.*, 2003). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la vía lactógena no es suficiente para mantener la infección de MV en el rebaño (Berriatua *et al.*, 2003; Álvarez *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2006), destacando la importancia de la vía horizontal, así como todas aquellas condiciones que la favorecen, en el mantenimiento y aumento de la prevalencia de la enfermedad en los rebaños. Asimismo, se ha descrito que las parasitosis broncopulmonares podrían favorecer la infección por el VMV y, aunque no hay un consenso al respecto, hay autores que afirman que la aplicación de tratamientos antihelmínticos profilácticos reducirían el riesgo de transmisión del VMV (Straub, 2004).

En todo programa de control se aconseja la identificación y eliminación de animales infectados y la prevención de nuevas infecciones (Houwens y Nauta, 1989), aunque muchas de las medidas descritas para disminuir la prevalencia del MV, como la separación al nacimiento de los corderos y cría con lactación artificial (Reina *et al.*,

2009), son difíciles o incluso imposibles de establecer debido a las condiciones de manejo de los rebaños de ovino de carne.

En Galicia, el MV es una enfermedad desconocida para la mayoría de propietarios de ovino de carne, donde previamente a este trabajo no se había realizado ningún estudio epidemiológico sobre la enfermedad. Sin embargo se trata de una enfermedad de distribución mundial y en España se ha documentado en todas las Comunidades Autónomas donde se han realizado estudios al respecto (Leginagoikoa, 2010). Ante la ausencia de datos epidemiológicos sobre el MV en Galicia y teniendo en cuenta las características de la enfermedad descritas anteriormente, este estudio nace ante la necesidad de determinar la prevalencia del MV de las explotaciones semiintensivas de ovino de carne de nuestra comunidad, con mayor orientación comercial, las cuales representan un 2% del total de las explotaciones ovinas gallegas y se encuentran adheridas a la Asociación de Defensa Sanitaria Ganadera (ADSG) de ovino y caprino de Galicia ACIVO.

Para la realización de este estudio se analizaron un total de 78 explotaciones semiintensivas de ovino de carne de Galicia, pertenecientes a la ADSG ACIVO, y que accedieron a formar parte del estudio de forma voluntaria. En cada explotación se tomaron muestras de sangre de todos los ovinos mayores de seis meses, alcanzando un total de 15.155 animales. A su vez, con objeto de analizar la presencia de larvas de parásitos broncopulmonares, en cada rebaño se recogieron muestras de heces de un porcentaje representativo de animales. En cada explotación incluida en el estudio se llevó a cabo una encuesta epidemiológica al propietario del mismo, realizada por un miembro del equipo investigador, a fin de obtener los datos relativos al manejo del rebaño.

Las muestras sanguíneas fueron analizadas mediante un ELISA de tipo indirecto mientras que las muestras de heces se procesaron mediante el método de migración larvaria de Baermann-Wetzel, procediéndose posteriormente al recuento total de larvas de cada muestra en una cámara de Favatti, contabilizándose las larvas de primer estadio (L1) de protostrongílidos y de *Dictyocaulus filaria*.

Para el estudio de los factores de riesgo de la enfermedad en las explotaciones de ovino de carne, las variables dependientes fueron la seropositividad a nivel de rebaño y a nivel individual. Las variables independientes empleadas fueron seleccionadas en base a una revisión bibliográfica previa, así como al posible impacto que los diferentes tipos de manejo pudieran ejercer sobre la seroprevalencia del MV. Se empleó tanto el test de Chi-cuadrado como la regresión logística múltiple para identificar posibles factores de riesgo a nivel de rebaño. En cuanto a la identificación de los factores de riesgo asociados a la seropositividad a nivel individual, se realizó un análisis de regresión lineal múltiple empleando las Ecuaciones de Estimación Generalizadas (GEE). De modo complementario, se realizó un estudio de las variables mediante el detector de interacción automatizada de Chi-cuadrado (CHAID) o árbol de clasificación, siendo el algoritmo utilizado para determinar diferencias significativas en la seroprevalencia individual (sobre el total de los datos y según zona geográfica: montaña o costa-centro) entre los factores significativos en el estudio univariable. Para el cálculo inferido de la incidencia del MV a partir de datos transversales se tomó como referencia el método publicado y validado por Rajan y Sokal (2010), con el que se puede obtener, a partir de datos de prevalencia de una enfermedad, una estimación de la incidencia de la misma en dicha población. El estudio de la relación entre parásitos broncopulmonares y el Maedi se realizó tomando como variables independientes aquellas obtenidas como factores de riesgo en el estudio de la seroprevalencia del MV a nivel individual, es decir, aquellas variables obtenidas en el modelo final de la ecuación de estimación generalizada, analizándola conjuntamente con los datos obtenidos en el estudio coprológico. Para ello se realizó previamente una transformación logarítmica del recuento larvario de protostrongídeos y *D. filaria* a fin de poder emplear los datos como una variable continua en el análisis estadístico. Se empleó el test de Chi-cuadrado y se analizó la posible presencia de factores confusores a través del análisis de regresión logística y el procedimiento de Mantel-Haentzel.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el 70,5% de las explotaciones estudiadas presentan al menos un animal seropositivo a VMV, que disminuyó hasta el 52,6% cuando el criterio de explotación seropositiva se hizo en base a una prevalencia real $(PR) \geq 1\%$. La seroprevalencia real individual alcanzó un

porcentaje del 23,3%. A pesar de ser valores elevados, y que demuestran una amplia diseminación de la enfermedad en los rebaños gallegos, los porcentajes son notablemente más reducidos si se comparan con otros estudios realizados en explotaciones semiintensivas de carne e intensivas de ovino de leche, lo que podría estar relacionado con las diferentes medidas de manejo llevadas a cabo en las distintas regiones. En apoyo de estas diferencias locales, los datos obtenidos en este estudio muestran que los ovinos de la zona costa-centro tienen mayor riesgo de infección y presentan mayores seroprevalencias que los de la montaña, lo que probablemente es debido a que los primeros sufren períodos de estabulación más largos durante todo el año, situación que se ha asociado de modo positivo con la infección por el VMV (Leginagoikoa *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2010).

El tamaño de rebaño y número de incorporación de animales en los últimos años mostraron una asociación significativa con la seroprevalencia del VMV a nivel de rebaño. Asimismo, la seroprevalencia individual del VMV aumentó significativamente con el tamaño de rebaño y la edad de los animales, tal como se ha descrito en estudios previos (Simard y Morley, 1991; Keen *et al.*, 1997a; Arsenault *et al.*, 2003; Berriatua *et al.*, 2003; Alba *et al.*, 2008). Los resultados estimados del riesgo de seroconversión muestran que los animales menores de cuatro años son los más susceptibles. A pesar de que en la infección por el VMV se ha descrito la seroconversión tardía (Sihvonen, 1980; Houwers *et al.*, 1987b; Rimstad *et al.*, 1993), los resultados estimados del riesgo de seroconversión muestran que los animales menores de cuatro años presentan una mayor susceptibilidad a adquirir la infección natural, de forma que todas aquellas prácticas de manejo que impidan la transmisión del VMV en estas edades tempranas adquieren gran importancia en el control de la enfermedad.

Uno de los resultados novedosos de este estudio ha sido identificar el contacto con ganado caprino como factor de riesgo para la infección con VMV a nivel individual, a pesar del bajo número de cabras en los rebaños mixtos. Estos datos deberían tenerse en cuenta a la hora de implementar un programa de prevención y control de la enfermedad (Pisoni *et al.*, 2005). De todos modos, son necesarios más estudios para

determinar el papel epidemiológico de las cabras como transmisoras del virus así como sobre la importancia relativa de las vías de transmisión.

Al tener en cuenta el periodo predestete (2-3 meses), los resultados obtenidos indican que mantener a los corderos alojados de forma conjunta y separados del resto del rebaño durante este periodo facilita la transmisión horizontal del MV, debido a que se mantienen estabulados permanentemente en un microclima menos ventilado y con mayor densidad de animales. De esta forma, los corderos infectados de forma temprana, bien a través de la vía lactogénica o a través del contacto estrecho con su madre durante los primeros días de vida, actúan como fuente de infección para el resto de los corderos. En resumen, el confinamiento de los corderos durante el periodo predestete representa un factor de riesgo para la infección por VMV y, por ello, esta práctica de manejo debería ser revisada.

Los resultados de este estudio muestran que la seroprevalencia del VMV fue mayor en ovejas infectadas con nematodos protostrongílidos que en aquellas no parasitadas. Sin embargo, al realizar el estudio multivariable, la posible relación existente entre la seropositividad al VMV y la infección causada por los protostrongílidos desaparece cuando la edad del animal es introducida como variable.

Finalmente, y ante los resultados obtenidos, se recomienda la aplicación de un programa de control y erradicación de la enfermedad en los rebaños de ovino de carne de Galicia con el objetivo de mejorar la viabilidad de las explotaciones, siempre teniendo en cuenta la estructura de los rebaños y el carácter práctico de las medidas aconsejadas. En aquellas explotaciones de ovino de carne en los que no se haya detectado animales seropositivos a la enfermedad es necesario mantener el estatus negativo del mismo, evitando la entrada de animales infectados. Estas explotaciones podrían actuar como fuente de recría de aquellas explotaciones positivas, hecho que se ve dificultado por el pequeño tamaño que en general presentan. En aquellas explotaciones con baja prevalencia (<25%) y con media y alta prevalencia (>25%), en caso de no ser posible la compra de recría procedente de rebaños seronegativos, se recomienda la compra de animales seronegativos procedentes de rebaños con menores seroprevalencias en comparación con la de destino. Ante esta situación se

hace necesario que las ADGs introduzcan el MV dentro de los programas control a fin de conocer el estado sanitario del ganado frente a esta enfermedad y poder elaborar de este modo una lista de carácter público, dando a conocer aquellas explotaciones libres de la misma o con baja seroprevalencia. De este modo estas explotaciones tendrían un valor añadido al ser certificadas como libres o de baja seroprevalencia, y además se facilitaría a los ganaderos interesados la compra de recría negativa. Aquellas explotaciones con prevalencias altas de MV tienen un margen de actuación más limitado a la hora de poner en práctica las medidas habituales para disminuir la prevalencia de la enfermedad, puesto que la disponibilidad de animales seronegativos para criar no es suficiente. Sin embargo, al tener en cuenta los resultados de este estudio donde se ha asociado determinadas prácticas de manejo con mayores seroprevalencias, se hace patente la posibilidad de poner en práctica ciertas medidas viables en este tipo de rebaños con el fin de disminuir la seroprevalencia del mismo. La recomendación de crear dos grupos teniendo en cuenta el estatus serológico de la madre, o en su defecto, la inclusión de los corderos con el rebaño adulto adquiere una gran importancia en este tipo de rebaños, donde las otras recomendaciones descritas en la literatura son poco factibles. Otra medida a tener en cuenta en todos los rebaños seropositivos, pero en especial en los de alta seroprevalencia, es la eliminación de los caprinos del rebaño ovino, o bien su separación física dentro del mismo, evitando su contacto, puesto que este ganado supone un factor de riesgo de la enfermedad. Con estas medidas descritas, que requieren un mínimo esfuerzo por parte del ganadero, podríamos estar ayudando a disminuir la prevalencia de la enfermedad en este tipo de explotaciones de elevada seroprevalencia, que en la actualidad están fuera de todo programa de control, y que en nuestro caso, aunque solo representan un 7% de las explotaciones estudiadas, son las de mayor tamaño y por lo tanto, con mayores expectativas comerciales y profesionales.

SUMMARY

The current delicate situation of the sheep meat market in both Spain and most Member States of the European Union (DG AGRI, 2012) is characterized by a drastic decrease in the number of sheep in the last five years and an increase in feed costs affecting especially the Southern Member States. Thus, it is necessary to increase farm profitability, which implies the implementation and improvement of control programs regarding those diseases causing relevant economic losses in sheep industry. The negative effects of Maedi Visna (MV) infection on both flock productivity and sheep industry economics have been previously reported, although economic cost often go unnoticed by owners since most infections are asymptomatic. In addition, no effective treatment and vaccines against Maedi Visna virus (VMV) infections are available; for those reasons control measures target animal management and husbandry.

The main routes of transmission of VMV are lactogenic, through ingestion of infected colostrum and milk (Pritchard and Dawson, 2000), and horizontal, through inhalation of respiratory secretions (Berriatua *et al.*, 2003). Sheep of all ages are susceptible to the infection. However, several studies suggest that lactogenic transmission may not be sufficient to maintain or increase infection rates in sheep flocks; consequently horizontal transmission must have a significant role in the persistence of VMV infection (Berriatua *et al.*, 2003; Álvarez *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2006). It has also been reported that lung nematodes could favor VMV infection and, although there is not a consensus, there are authors who assessed that regular prophylactic treatments with anthelmintic drugs reduce the risk of VMV transmission (Straub, 2004). Identification of infected animals and their elimination from the flock, just as prevention of new infections are strongly recommended in all MV control programs (Houwers and Nauta, 1989). However, many of the measures used for decreasing the incidence of MV, such as separating the lamb from its mother after birth or bottle feeding lambs (Reina *et al.*, 2009), are difficult or even impossible to carry out due to the production system of meat sheep flocks.

VMV is worldwide distributed and it has been documented in all the Spanish regions where studies on the MV were done (Leginagoikoa, 2010). However, in Galicia, most owners of meat sheep flocks are unaware of the MV disease and, prior to this

study, no epidemiological work on the disease was carried out. The absence of epidemiological data regarding MV in Galicia led us to conduct a cross-sectional survey to determine the seroprevalence and the main risk factors associated with VMV infection in commercial semiintensive lamb producing flocks as a prelude to establishing a suitable control program in this Autonomous Community. Commercial lamb producing flocks represent 2% of sheep farms in Galicia and all belong to the Galician Health Association of Ovine and Caprine breeders (ACIVO).

Producers from 78 commercial meat sheep flocks belonging to ACIVO participated voluntarily in the present study. A total of 15,155 sheep blood samples were collected from the jugular vein. In each farm, fecal samples from a representative percentage of animals were also collected in order to analyze the presence of bronchopulmonary larvae. A management questionnaire was carried out in each farm included in the study.

Blood samples were tested for anti-VMV antibodies with a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (Pourquier MV/CAEV, Indirect ELISA/Screening, France) whereas fecal samples were processed by the Baermann-Wetzel technique for the detection of protostrongylid and *Dictyocaulus filaria* first stage larvae (L1).

Individual and flock level seropositivity were used as dependent variables in the risk factor study. The explanatory variables used were selected on the basis of a comprehensive review of the literature and on the potential impact that different flock management practices would have on the MV. The Chi-square test and multiple logistic regression models were used to identify potential risk factors at flock level, besides Generalized Estimating Equations (GEE) were used at individual level. The Exhaustive chi-squared automated interaction detector, classification tree algorithm (CHAID) was also used to determine significant differences between animal seropositivity and those variables that were statistically significant in the univariable analysis. The method published and validated by Rajan and Sokal (2010) to estimate HIV incidence from cross-sectional data was used to estimate VMV incidence in semiintensive lamb producing flocks. The associations between lungworm and VMV infection were studied individually with a Chi-square test, calculated with the exact

method, 95% confidence interval, chi-squared and Fisher's exact tests. Logistic regression analysis and Mantel-Haentzel procedure function were used to detect potential confounding factors. Protostrongylid and *D. filaria* larvae output were previously log-transformed to introduce them as continuous variables in the logistic regression analysis.

In the present study, 70.5% of the flocks studied have at least one seropositive sheep to VMV. In addition, 52.6% of the flocks examined had a true seroprevalence $\geq 1\%$ and 23.27% of tested animals were VMV-seropositive. The individual seropositivity in Galicia are lower compared with studies in semiintensive lamb producing flocks and intensive dairy sheep from other Spanish areas; those differences could be related to diverse management measures. In support of these local differences, our data show that sheep from central coast area have higher risk of infection and seroprevalence than those from mountainous areas. This situation could be probably due to longer period of housing in central-coast area throughout the year, which is positively associated with VMV infection (Leginagoikoa *et al.*, 2010, Perez *et al.*, 2010).

Flock size and number of sheep purchase in previous five were positively and independently associated with flock seroprevalence. In addition, individual seroprevalence increased significantly with flock size and the age of the animals, as was described in previous studies (Simard and Morley, 1991, Keen *et al.*, 1997a; Arsenault *et al.*, 2003; Berriatua *et al.*, 2003; Alba *et al.*, 2008). The estimated VMV incidence showed that animals under four years are the most susceptible to infection. Although late seroconversion has been reported in VMV infection (Sihvonen, 1980; Houwers *et al.*, 1987b; Rimstad *et al.*, 1993), the estimated VMV incidence showed that animals under four years have greater risk of VMV seroconversion and increased susceptibility to acquire VMV infection. Thus, all management practices preventing VMV transmission during this period become crucial to introduce a proper disease control program.

A remarkable finding of this study is the important role that goats play in VMV infection within a sheep flock. Our results show that contact between sheep and goats

is a risk factor for VMV despite the low number of goats in mixed flocks. Furthermore, these results showed that interspecies transmission is more frequent than it has been previously thought and it should be considered when putting into practice a control program of MV (Pisoni *et al.*, 2005). However, since presence of goats is common in sheep flocks from most of lamb-producing regions, additional studies should be performed to determine which of the two main VMV transmission routes (lactogenic or horizontal) is dominant in interspecies transmission.

The present study reveals that confinement of lambs in preweaning lamb groups is positively related with VMV seroprevalence. Indoor preweaning housing with other lambs, characterized by less ventilation, high animal density and long confinement time, facilitates horizontal transmission. Thus, lambs infected through colostrum or milk, or through contact with their dam in the early days of their life, can act as a source of infection to other lambs. Our results provide epidemiological evidence that horizontal transmission between lambs occurs and that housing of lambs during the preweaning period influences disease seroprevalence. Therefore this management practice should be reviewed.

Protostrongylid infection was considered as a risk factor for MV by using univariate statistical analysis but neglected in a logistic multivariate regression when the age of the animals was introduced as variable. As MV, protostrongylid infection is a chronic disease with a cumulative pattern over time, so that these two infections are closely related to the age of animals. When the Mantel-Haenszel technique was applied, small lungworm infection was detected as a confounding variable with no real effect on Maedi-Visna infection.

Finally, taking into account the results obtained, MV control and eradication program should be put into practice in semiintensive lamb producing flocks from Galicia in order to improve the viability of farms. Seronegative flocks should keep the negative status through preventing the entry of infected animals. These farms could be used as a source of seronegative lambs for seropositive flocks. Nevertheless, that is difficult to put into practice because seronegative flocks are generally the smallest. If seropositive farms could not purchase animals from seronegative flocks, they should

get them from flocks with lower seroprevalences compared with the target. In this situation, MV control program should be introduced in ADSGs sanitary programs. Furthermore, ADSGs should develop a public list revealing both seronegative and low-seroprevalence flocks. Thus, these farms would have a value-added characteristic since they could be certified as VMV free or with low seroprevalence, making the purchase of seronegative lambs easier for farmers. The situation of flocks with high VMV seroprevalence is quite complicated because the standard measures to reduce MVV seroprevalence are less effective. However, since the present study shows that some management practices have been associated with higher seroprevalences, it is possible to implement feasible measures in those high seroprevalence flocks to reduce the percentage of VMV-infected animals. First of all, confinement of lambs in preweaning lamb groups is a practice that should be avoided, and creation of two lamb rearing groups considering the dam's VMV serological status at lambing is strongly recommended. Housing of lambs with the adult flock is also a good practice. Secondly, removal of goats from sheep flocks or avoid a physical contact with them should be considered, since sheep and goat contact had been identified in this study as a risk factor for the MV disease. We could be helping to reduce the VMV seroprevalence with the measures described above, which require a minimal effort from the farmer. Moreover, these measures could be feasible in farms with high seroprevalence, where the measures described up to now are difficult to put into practice. In Galicia, although these flocks only represent 7% of the farms studied, they are the largest and consequently those with greater trade and professional expectations.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abril F., Alpuente P., Ramo A., Ruz J.M., Adeva R. 2004. Estudio serológico del Visna-Maedi en las razas ovinas: Rasa Aragonesa, Ojinegra, Cartera y Maellana, en la provincia de Teruel y comparación de las pruebas de diagnóstico serológico entre IDGA y ELISA. 2004. XXIX Jornadas Científicas VIII Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC). Lleida, España. 234-236.
- Adams D.S., Klevjer-Anderson P., Carlson J.L., McGuire T.C., Gorham J.R. 1983. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am J Vet Res* 44(9):1670-1675.
- Agnarsdóttir G., Thorsteinsdóttir H., Oskarsson T., Matthíasdóttir S., St Haflídadóttir B., Andresson O.S., Andrésdóttir V. 2000. The long terminal repeat is a determinant of cell tropism of Maedi-visna virus. *J Gen Virol* 81(8):1901-1905.
- Akkan H.A., Karaca M., Tutuncu M., Keles I., İlhan F., Cetin Y., Ozkan C., Bakir B., Tasal I. 2009. Investigation of the Seroprevalance of Maedi-Visna in the Region of Van Using Elisa and Histopathological Findings. *J A Vet Adv* 8(8):1495-1498.
- Alemu S., Leykun E.G., Ayelet G., Zeleke A. 2006. Study on small ruminant lungworms in northeastern Ethiopia. *Vet Parasitol* 142:330-335.
- Alba A., Allepuz A., Serrano E., Casal J. 2008. Seroprevalence and spatial distribution of Maedi-Visna virus and pestiviruses in Catalonia (Spain). *Small Rum Res* 78:80-86.
- Albayrak H., Yazici Z., Okur-Gumusova S., Ozan E. 2011. Maedi-visna virus infection in Karayaka and Amasya Herik breed sheep from provinces in northern Turkey. *Trop Anim Health Prod* 44(5):939-941.
- Alkan F. y Tan M.T. 1998. A comparative study on the diagnosis of Maedi-Visna infection in serum and colostrum samples using agar gel immunodiffusion (AGID) technique. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 105:276-278.
- Ali Al Ahmad M.Z., Fieni F., Martignat L., Chatagnon G., Baril G., Bouvier F., Chebloune Y. 2005. Proviral DNA of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is detected in cumulus oophorus cells but not in oocytes from naturally infected goats. *Theriogenol* 64(7):1656-1666.
- Ali Al Ahmad M.Z., Chebloune Y., Bouzar B.A., Baril G., Bouvier F., Chatagnon G., Leboeuf B., Pepin M., Guibert J.M., Russo P., Manfredi E., Martin J., Fieni F. 2007a. Lack of risk of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) after an appropriate embryo transfer procedure. *Theriogenol* 69(4):408-415.
- Ali Al Ahmad M.Z., Fieni F., Pellerin J.L., Guiguen F., Cherel Y., Chatagnon G., Bouzar A.B., Chebloune Y. 2007b. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. *Theriogenol* 69(4):473-480.

- Álvarez V. 2005. Estudio epidemiológico y experimental de la transmisión y control del virus Maedi-Visna en ovino lechero de raza latxa del país vasco. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Álvarez V., Arranz J., Daltabuit-Test M., Leginagoikoa I., Juste R.A., Amorena B., De Andrés D., Luján L.L., Badiola J.J., Berriatua E. 2005. Relative contribution of colostrum from Maedi-Visna virus (MVV) infected ewes to MVV-seroprevalence in lambs. *Res Vet Sci* 78(3):237-243.
- Álvarez V., Daltabuit-Test M., Arranz J., Leginagoikoa I., Juste R.A., Amorena B., de Andrés D., Luján L., Badiola J.J., Berriatua E. 2006. PCR detection of colostrum-associated Maedi-Visna virus (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs. *Res Vet Sci* 80(2):226-234.
- Ameztoy J.M., Santamaría C., Muñoz P. 1998. Seroprevalencia de Maedi-visna en explotaciones ovinas del centro y sur de Navarra. *Medicina Veterinaria* 15(1):28-31.
- Amorena B., Monleon E., Pacheco C., Pérez M., Monzon M., Gracia E., Rota C. 1997. Tendencias actuales en los métodos de diagnóstico de interés epidemiológico. *Med Vet* 14:305-318.
- Amorena B., González B., Andrés S. 2001. Mecanismos patogénicos y respuesta inmune. *Ovis* 72:27-40.
- Anderson B.C., Bulgin M.S., Adams S., Duelke B. 1985. Firm udder in periparturient ewes with lymphocytic accumulations, retrovirus infection and milk unavailable at the teat. *J Am Vet Med Assoc* 186(4):391-393.
- Andréðóttir V., Tang X., Agnarsdóttir G., Andresson O.S., Georgsson G., Skraban R., Torsteinsdóttir S., Rafnar B., Benediktsdóttir E., Matthiasdóttir S. 1998. Biological and genetic differences between lung-and brain-derived isolates of Maedi-Visna virus. *Virus Genes* 16(3):281-293.
- Andréðóttir V., Skraban R., Matthiasdóttir S., Lutley R., Agnarsdóttir G., Thorsteinsdóttir H. 2002. Selection of antigenic variants in Maedi-visna virus infection. *J Gen Virol* 83(10):2543-2551.
- Angelopoulou K., Brellou G.D., Vlemmas I. 2006. Detection of Maedi-visna virus in the kidneys of naturally infected sheep. *J Comp Pathol* 134(4):329-335.
- Angelopoulou K., Poutahidis T., Brellou G.D., Greenland T., Vlemmas I. 2007. A deletion in the R region of long terminal repeats in small ruminant lentiviruses is associated with decreased pathology in the lung. *Vet J* 175(3):346-355.
- Armour J., Bairden K., Pirie H.M., Ryan W.G. 1987. Control of parasitic bronchitis and gastroenteritis in grazing cattle by strategic prophylaxis with ivermectin. *Vet Rec* 121:5-8.

- Arsenault J., Dubreuil P., Girard C., Simard C., Bélanger D. 2003. Maedi-Visna impact on productivity in Quebec sheep flocks (Canada). *Prev Vet Med* 59(3):125-137.
- Artigas C., Vendrell J., Mejías J.M. 1999. Estudio seroepidemiológico frente a Chlamydiosis, Visna-Maedi y Toxoplasmosis en 64 rebaños de la sierra norte de Sevilla. XXIV Jornadas científicas y III Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC). Soria, España. 287-290.
- Ayelet G., Roger F., Tibbo M., Tembely S. 2001. Survey of Maedi-Visna (MV) in Ethiopian highland sheep. *Vet J* 161(2):208-210.
- Azkur A.K., Gazyagci S., Aslan M.E. 2011. Serological and Epidemiological Investigation of Bluetongue, Maedi-Visna and Caprine Arthritis-Encephalitis Viruses in Small Ruminant in Kirikkale District in Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 17(5):803-808.
- Banks K.L., Adams D.S., McGuire T.C., Carlson J. 1983. Experimental infection of sheep by caprine arthritis-encephalitis virus and goats by progressive pneumonia virus. *Am J Vet Res* 44(12):2307-2311.
- Barros S.C., Ramos F., Duarte M., Fagulha T., Cruz B., Fevereiro M. 2004. Genomic characterization of a slow/low maedi visna virus. *Virus Genes* 29(2):199-210.
- Barros S.C., Andrésdóttir V., Fevereiro M. 2005. Cellular specificity and replication rate of Maedi Visna virus in vitro can be controlled by LTR sequences. *Arch Virol* 150(2):201-213.
- Begara I., Luján L., Hopkins J., Collie D.D.S., Miller H.R.P., Watt N.J. 1995. A study on lymphocyte activation in Maedi-Visna virus induced pneumonia. *Vet Immunol Immunopathol* 45(3-4):197-210.
- Begara I., Luján L., Collie D.D.S., Miller H.R.P., Watt N.J. 1996. Early pulmonary cell response during experimental Maedi-Visna virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 55(1-3):115-126.
- Belino E.D. and Ezeifeka G.O. 1984. Maedi-Visna antibodies in sheep and goats in Nigeria. *Vet Rec* 114(23):570-593.
- Benavides J., Fuertes M., García-Pariente C., Ferreras M.C., García-Marín J.F., Pérez V. 2006a. Natural cases of visna in sheep with myelitis as the sole lesion in the central nervous system. *J Comp Pathol* 134(2-3):219-230.
- Benavides J., Gómez N., Gelmetti D., Ferreras M.C., García-Pariente C., Fuertes M., García-Marín J.F., Pérez V. 2006b. Diagnosis of the nervous form of Maedi-Visna infection with a high frequency in sheep in Castilla y León, Spain. *Vet Rec* 158(7):230-235.

- Benavides J., García-Pariente C., Carmen F.M., Fuertes M., Francisco Garcia-Marin J., Pérez V. 2007. Diagnosis of clinical cases of the nervous form of Maedi-Visna in 4-and 6-month-old lambs. *Vet J* 174(3):655-658.
- Berriatua E., Álvarez V., Extramiana B., González L., Daltabuit M., Juste R. 2003. Transmission and control implications of seroconversion to Maedi-Visna virus in Basque dairy-sheep flocks. *Prev Vet Med* 60(4):265-279.
- Bertoni G., Zahno M.L., Zannoni R., Vogt H.R., Peterhans E., Ruff G., Cheevers W.P., Sonigo P., Pancino G.. 1994. Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp38 transmembrane protein associates with the development of arthritis. *J Virol* 68(11):7139-7147.
- Biescas E., Luján L., Cáncer J., Pérez M., Bolea R., Bernal M.C., Abril F., Malo J.M., Badiola J.J. 2004. Campaña de sondeo serológico y control del Maedi-Visna en Aragón: resultados 2002-2003. XXIX Jornadas Científicas VIII Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC). Lleida, España. 234-236.
- Biescas E. 2006. Contribución al estudio serológico, lesional, diagnóstico y preventivo del Maedi Visna ovino. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Bird P., Blacklaws B., Reyburn H.T., Allen D., Hopkins J., Sargan D., McConnell I. 1993. Early events in immune evasion by the lentivirus Maedi-Visna occurring within infected lymphoid tissue. *J Virol* 67(9):5187-5197.
- Bird P., Reyburn H.T., Blacklaws B.A., Allen D., Nettleton P., Yirrell D.L., Watt N., Sargan D., McConnell I. 1995. The restricted IgG1 antibody response to Maedi Visna virus is seen following infection but not following immunization with recombinant gag protein. *Clin Exp Immunol* 102(2):274-280.
- Blacklaws B.A., Berriatua E., Torsteinsdottir S., Watt N.J., De Andrés D., Klein D., Harkiss G.D. 2004. Transmission of small ruminant. *Vet Microbiol* 101(3):199-208.
- Blood D.C. y Studdert V.P. 1988. Diccionario de veterinaria. Interamericana McGraw-Hill.
- Bolea R. 1998. Estudios de la presencia del virus Maedi-Visna en la glándula mamaria ovina. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Bolea R., Monleon E., Carrasco L., Vargas A., De Andrés D., Amorena B., Badiola J.J., Luján L. 2006. Maedi-visna virus infection of ovine mammary epithelial cells. *Vet Res* 37(1):133-44.
- Bouljihad M. and Leipold H.W. 1994. Ovine lentiviral infection (Maedi/Visna) in Morocco: a serologic and postmortem survey. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 41:317-328.

- Brahic M. y Haase A.T. 1981. Lentivirinae: Maedi/Visna virus group infections. Comparative aspects and diagnosis. In: Comparative Diagnosis of Viral Disease. Kurstak E., Kurstak C. Editors. Academic Press. New York. 619-643.
- Braun M.J., Clements J.E., Gonda M.A. 1987. The Visna virus genome: Evidence for a hypervariable site in the *env* gene and sequence homology among lentivirus envelope proteins. J Virol 61(12):4046-4054.
- Brinkhof J.M y Van Maanen C. 2007. Evaluation of five enzyme-linked immunosorbent assays and an agar gel immunodiffusion test for detection of antibodies to small ruminant lentiviruses. Clin Vaccine Immunol 14(9):1210-1214.
- Brinkhof J.M., Van Maanen C., Wigger R., Peterson K., Houwers D.J. 2008. Specific detection of small ruminant lentiviral nucleic acid sequences located in the proviral long terminal repeat and leader-gag regions using real-time polymerase chain reaction. J Virol Methods 147(2):338-344.
- Brinkhof J.M., Moll L., Van Maanen C., Houwers D.J. 2010. Use of serology and polymerase chain reaction for the rapid eradication of small ruminant lentivirus infections from a sheep flock: A case report. Res Vet Sci 88(1):41-43.
- Brodie S.J., Marcom K.A., Pearson L.D., Anderson B.C., De la Concha-Bermejillo A., Ellis J.A., DeMartini J.C. 1992. Effects of virus load in the pathogenesis of lentivirus-induced lymphoid interstitial pneumonia. J Infect Dis 166(3):531-341.
- Brodie S.J., De La Concha-Bermejillo A., Koenig G., Snowden G.D., DeMartini J.C. 1994. Maternal factors associated with prenatal transmission of ovine lentivirus. J Infect Dis 169(3):653-657.
- Brodie S.J., Pearson L.D., Zink M.C., Bickle H.M., Anderson B.C., Marcom K.A., DeMartini J.C. 1995. Ovine lentivirus expression and disease. Virus replication, but not entry, is restricted to macrophages of specific tissues. Am J Pathol 146(1):250-263.
- Brodie S.J., De La Concha-Bermejillo A., Snowden G.D., DeMartini J.C. 1998. Current concepts in the epizootiology, diagnosis, and economic importance of ovine progressive pneumonia in North America: A review. Small Rum Res 27(1):1-17.
- Bruett L., Barber S.A., Clements J.E. 2000. Characterization of a membrane-associated protein implicated in Visna virus binding and infection. Virology 271(1):132-141.
- Brugère-Picoux J. 2004. Maladies des moutons. 2nd Edition. France Agricole, Paris.
- Brülisauer F., Vogt H., Perler L., Rufenacht J. 2005. Risk factors for the infection of Swiss goat herds with small ruminant lentivirus: a case-control study. Vet Rec 157(8):229-233.

- Bulgin M.S. 1990. Ovine Progressive Pneumonia, Caprine Arthritis-encephalitis, and related lentiviral diseases of sheep and goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 6(3):691-704.
- Burgu I., Toker A., Akca Y., Alkan F., Yazici Z., Ozkul A. 1994. Serological investigations on Maedi-Visna infection in Turkey. *National Veterinary Microbiology Congress*, Ankara:64.
- Cabalar M. y Kozat S. 2004. Seroprevalence of Maedi–Visna infection in sheep in Van, Turkey. In: *Proceedings of the sixth national veterinary microbiology congress*. Elazúg, Turkey.
- Cabaret J., Dakkak A., Alahkam L. 1978. Considerations sur l'élimination des larves L1 de protostrongyloides dans les feces des ovins nature de la distribution, influence de l'âge de l'animal et des traitements anthelminthiques. *Ann Soc Belge Méd Trop* 58:309-314.
- Cadoré J.L., Loubeyre P., Vuillermoz S. 1997. Early diagnosis of lentivirus-induced infiltrative lung disease in sheep by high resolution computed tomography. *Eur Respir J* 10(7):1456-1459.
- Campbell R.S.F. y Robinson W.F. 1998. The comparative pathology of the lentiviruses. *J Comp Pathol* 119(4):333-395.
- Caporale V.P., Foglini A., Lelli R., Mantovani A., Nannini D., Simoni P. 1983. Preliminary observations on the presence of visna-maedi in Italy. *Vet Res Commun* 6(1):31-35.
- Carbonero A., Saa L.R., Arenas A., Borge C., Perea A. 2011. Seroprevalence and risk factors associated to Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) infection in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. *Prev Vet Med* 100:84-88.
- Carey N. y Dalziel R.G. 1993. The biology of Maedi-Visna virus, an overview. *Br Vet J* 149(5):437-454.
- Celer J.V., Celer V., Němcová H., Zanoni R.G., Peterhans E. 1998. Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole virus ELISA and AGID test. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 45(1-10):183-188.
- Celer J.V., Celer V., Nejdlá E., Bertoni G., Peterhans E., Zanoni R.G. 2000. The detection of proviral DNA by semi-nested polymerase chain reaction and phylogenetic analysis of Czech Maedi-Visna isolates based on *gag* gene sequences. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47(3):203-215.
- Chebloune Y., Karr B., Sheffer D., Leung K., Narayan O. 1996. Variations in lentiviral gene expression in monocyte-derived macrophages from naturally infected sheep. *J Gen Virol* 77(9):2037-2051.

- Cheevers W., Cordery-Cotter R., McGuire T., DeMartini J. 1999. Neutralizing antibody responses and evolution of antigenic variants in monozygotic twin lambs infected with phenotypically distinct ovine lentiviruses. *Virology* 258(2):382-388.
- Christodoulouopoulos G. 2005. Milk production and milk fat content in commercial karagouniko breed flocks infected by Maedi in Greece. In: *Proceedings of the Sixth International Sheep Veterinary Congress*. Crete, Greece. 344-345.
- Christodoulouopoulos G. 2006. Maedi–Visna: Clinical review and short reference on the disease status in mediterranean countries. *Small Rumin Res* 62(1-2):47-53.
- Cienfuegos S., Vázquez L., Dacal V., Pardo M.; Fernández G., Lago N., Morrondo P., López C. 2007. Estudio preliminar de las nematodosis broncopulmonares en el ganado ovino de Galicia. *Congreso Iberico de Parasitologia*. Madrid.
- Clements J.E., Gdovin S.L., Montelaro R.C., Narayan O. 1988. Antigenic variation in lentiviral diseases. *Annu Rev Immunol* 6(1):139-159.
- Clements J.E. y Zink M.C. 1996. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clin Microbiol Rev* 9(1):100-117.
- Coffin J.M. 1996a. Retrovirus restriction revealed. *Nature* 382:762-763.
- Coffin J.M. 1996b. Retroviridae: the viruses and their replication. In: *Fields Virology*. 3rd Edition. Knipe D.M., Howley P.M., Channock R. M., Melnick J. L., Monath T. M., Roizman B., Straus S. E. Editors. Lippincott-Raven. Philadelphia. 1767-1848.
- Comité Internacional de Taxonomía Vírica. ICTV Master Species List, 2011. <http://www.ictvonline.org>.
- Consellería de Medio Rural. Anuarios de estadística agraria, 2007. http://mediorural.xunta.es/institucional/estadisticas/gando_ovino_e_cabrun.
- Cortez R.C., Fieni F., Roux C., Russo P., Guibert J.M., Guiguen F., Chebloune Y., Pepin M., Pellerin J.L. 2006. Detection of ovine lentivirus in the cumulus cells, but not in the oocytes or follicular fluid, of naturally infected sheep. *Theriogenol* 66(5):1131-1139.
- Craig L.E., Sheffer D., Meyer A.L., Hauor D., Lechner F., Peterhans E., Adams R.J., Clements J.E., Narayan O., Zink M.C. 1997. Pathogenesis of ovine lentiviral encephalitis: derivation of a neurovirulent strain by in vivo passage. *J Neurovirol* 3(6):417-427.
- Crane S.E., Buzy J., Clements J.E. 1991. Identification of cell membrane proteins that bind Visna virus. *J Virol* 65(11):6137-6143.
- Crespo H., Reina R., Glaria I., Ramírez H., De Andrés X., Jáuregui P, Luján L, Martínez-Pomares L., Amorena B., De Andrés D.F. 2011. Identification of the ovine

- mannose receptor and its possible role in Visna/Maedi virus infection. *Vet Res* 42(1):28-38.
- Cross R.F., Smith C.K., Moorhead P.D. 1975. Vertical transmission of progressive pneumonia of sheep. *Am J Vet Res* 36(4):465-468.
- Cutlip R.C. y Laird G.A. 1976. Isolation and characterization of a virus associated with progressive pneumonia (Maedi) of sheep. *Am J Vet Res* 37(12):1377-1382.
- Cutlip R.C., Jackson T.A., Laird G.A. 1977. Immunodiffusion test for Ovine Progressive Pneumonia. *Am J Vet Res* 38(7):1081-1084.
- Cutlip R.C., Jackson T.A., Lehmkuhl H.D. 1979. Lesions of Ovine Progressive Pneumonia: Interstitial pneumonitis and encephalitis. *Am J Vet Res* 40(10):1370-1374.
- Cutlip R.C., Lehmkuhl H.D., Jackson T.A. 1981. Intrauterine transmission of Ovine Progressive Pneumonia Virus. *Am J Vet Res* 42(10):1795-1797.
- Cutlip R.C., Lehmkuhl H.D., Whipp S.C., McClurkin A.W. 1982. Effects on ovine fetuses of exposure to Ovine Progressive Pneumonia Virus. *Am J Vet Res* 43(1):82-85.
- Cutlip R.C., Lehmkuhl H.D., Brogden K.A., Bolin S.R. 1985a. Mastitis associated with Ovine Progressive Pneumonia Virus infection in sheep. *Am J Vet Res* 46(2):326-328.
- Cutlip R.C., Lehmkuhl H.D., Wood R.L., Brogden K.A. 1985b. Arthritis associated with Ovine Progressive Pneumonia. *Am J Vet Res* 46(1):65-68.
- Cutlip R.C. y Lehmkuhl H.D. 1986. Eradication of Ovine Progressive Pneumonia from sheep flocks. *J Am Vet Med Assoc* 188(9):1026-1027.
- Cutlip R.C., Lehmkuhl H.D., Brogden K.A., Sacks J.M. 1986. Breed susceptibility to Ovine Progressive Pneumonia (Maedi/Visna) Virus. *Vet Microbiol* 12(3):283-288.
- Cutlip R.C., Lehmkuhl H.D., Schmerr M.J.F., Brogden K.A. 1988. Ovine Progressive Pneumonia (Maedi-Visna) in sheep. *Vet Microbiol* 17(3):237-250.
- Cutlip R.C., Lehmkuhl H.D., Brogden K.A., Schmerr M.J. 1991. Seroprevalence of Ovine Progressive Pneumonia virus in various domestic and wild animal species, and species susceptibility to the virus. *Am J Vet Res* 52(2):189-191.
- Cutlip R.C., Lehmkuhl H.D., Sacks J.M., Weaver A.L. 1992. Seroprevalence of Ovine Progressive Pneumonia virus in sheep in the United States as assessed by analyses of voluntarily submitted samples. *Am J Vet Res* 53(6):976-979.

- Daltabuit-Test M. 2005. Desarrollo y aplicacion de técnicas de diagnostico serologico y molecular para el estudio de la transmision calostrual y horizontal del virus Maedi-Visna (VMV) en ovino. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Dalziel R.G., Hopkins J., Watt N.J., Dutia B.M., Clarke H.A.K., McConnell I. 1991. Identification of a putative cellular receptor for the lentivirus Visna virus. *J Gen Virol* 72(8):1905-1911.
- Davis J.L. y Clements J.E. 1989. Characterization of a cDNA clone encoding the Visna Virus transactivating protein. *Proc Natl Acad Sci* 86(2):414-418.
- Dawson M. 1980. Maedi/Visna: A review. *Vet Rec* 106(10):212-216.
- Dawson M., Venables C., Jenkins C.E. 1985. Experimental infection of a natural case of Sheep Pulmonary Adenomatosis with Maedi/Visna virus. *Vet Rec* 116:588-589.
- Dawson M. 1987. Pathogenesis of Maedi-Visna. *Vet Rec* 120(19):451-454.
- Dawson M., Done S.H., Venables C., Jenkins C.E. 1990. Maedi-Visna and sheep pulmonary adenomatosis: a study of concurrent infection. *Br Vet J* 146(6):531-538.
- De Andrés D., Klein D., Watt N.J., Berriatua E., Torsteinsdottir S., Blacklaws B.A., Harkiss G.D. 2005. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Vet Microbiol* 107(1-2):49-62
- De Boer G.F. 1970. Antibody formation in Zwoegerziekte, a slow infection in sheep. *J Immunol* 104(2):414-422.
- De Boer G.F. y Terpstra C. 1974. De verbreiding van besmettingen met zwoegerziektevirus bij Nederlandse schapen. *Tijdschr Diergeneeskde* 99:655-658.
- De Boer G.F. 1975. Zwoegerziekte virus, the causative agent for progressive interstitial pneumonia (Maedi) and meningo-leucoencephalitis (Visna) in sheep. *Res Vet Sci* 18(1):15-25.
- De Boer G.F., Terpstra C., Houwers D.J. 1978. Studies of Zwoegerziekte (Maedi) in the Netherlands, a review. *Bull Off Int Epiz* 89:487-506.
- De Boer G.F. y Houwers D.J. 1979. Epizootiology of Maedi/Visna in sheep. In: *Aspects of slow and persistent virus infections*. Tyrrel D.A.J. Editor. Brussels, Luxembourg. 198-221.
- De Boer G.F., Terpstra C., Houwers D.J., Hendriks J. 1979. Studies in epidemiology of Maedi/Visna in sheep. *Res Vet Sci* 26(2):202-208.

- De Kock G. 1929. Are the lesions of Jaagsiekte in sheep of the nature of a neoplasm? Annual Report of the Director of Veterinary Services: 611.
- De la Concha-Bermejillo A., Brodie S.J., Magnus-Corral S., Bowen R.A., DeMartini J.C. 1995. Pathologic and serologic responses of isogeneic twin lambs to phenotypically distinct lentiviruses. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 8(2):116-123.
- De la Concha-Bermejillo A., Magnus-Corral S., Brodie S.J., DeMartini J.C. 1996. Venereal shedding of ovine lentivirus in infected rams. *Am J Vet Res* 57(5):684-688.
- De la Concha-Bermejillo A. 1997. Maedi-Visna and Ovine Progressive Pneumonia. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13(1):13-33.
- De la Cruz M., Serrano E., Montoro V., Marco J., Romeo M., Baselga R., Albizu I., Amorena B. 1994. Etiology and prevalence of subclinical mastitis in the manchega sheep at mid-late lactation. *Small Rumin Res* 14(2):175-180.
- DeMartini J.C., Bowen R.A., Carlson J.O., De la Concha-Bermejillo A. 1991. Strategies for the genetic control of ovine lentivirus infections. In: *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*. Axford R.F.E., Bishop S.C., Nicholas F.W. Editors. CAB International. Wallingford, UK. 293-314.
- Deng P., Cutlip R.C., Lehmkuhl H.D., Brogden K.A. 1986. Ultrastructure and frequency of mastitis caused by Ovine Progressive Pneumonia virus infection in sheep. *Vet Pathol* 23(2):184-189.
- DG AGRI. 2012. EU Sheep and Goats Meat Market Situation. European Comission.
- Díez-Baños. P., Morrondo-Pelayo P., Feijóo A., Carrillo E.B., López C. 1989. Infestación natural de *Cochlicella barbara* (Mollusca) por larvas de Protostrongylidae (Nematoda). VI Congreso Nacional y I Congreso Ibérico de Parasitología. Cáceres. 137.
- Díez-Baños. P., Morrondo-Pelayo P., Carrillo-González B., López-Sández C., Feijóo-Penela A. 1994. Relationship between the excretion of protostrongylid larvar in sheep in North-west Spain and climatic conditions. *J Helmintho* 68:197-201.
- Díez-Baños P., Morrondo P., Díez-Baños N. 1999. Parasitosis respiratorias. In: *Parasitología Veterinaria*. Cordero M., Rojo F.A. Editors. Mc Graw-Hill-Interamericana. 374-400.
- Dohoo I.R., Heaney D.P., Stevenson R.G., Samagh B.S., Rhodes C.S. 1987. The effects of Maedi-Visna virus infection on productivity in ewes. *Prev Vet Med* 4(5-6):471-484.

- Dungu B., Vorster J., Bath G.F., Verwoerd D.W. 2000. The effect of a natural Maedi-Visna virus infection on the productivity of south african sheep. *Onderstepoort J Vet Res* 67(2):87-96.
- East N.E., Rowe J.D., Madewell B.R., Floyd K. 1987. Serologic prevalence of Caprine Arthritis-Encephalitis virus in California goat dairies. *J Am Vet Med Assoc* 190(2):182-186.
- Elder J.H., Lerner D.L., Hasselkus-Light C.S., Fontenot D.J., Hunter E., Luciw P.A., Montelaro R.C., Phillips T.R. 1992. Distinct subsets of retroviruses encode dUTPase. *J Virol* 66(3):1791-1794.
- Ellis T., Robinson W., Wilcox G. 1983. Effect of colostrum deprivation of goat kids on the natural transmission of caprine retrovirus infection. *Aust Vet J* 60(11):326-329.
- Ellis J.A. y DeMartini J.C. 1985a. Immunomorphologic and morphometric changes in pulmonary lymph nodes of sheep with progressive pneumonia. *Vet Pathol* 22(1):32-41.
- Ellis J.A y DeMartini J.C. 1985b. Ovine interleukin-2: Partial purification and assay in normal sheep and sheep with Ovine Progressive Pneumonia. *Vet Immunol Immunopathol* 8(1-2):15-25.
- Else K.J. 2005. Have gastrointestinal nematodes outwitted the immune system? *Parasite Immunol* 27(10-11):407-415.
- Espí A., Prieto J.M., Álvarez M. 2001. Situación sanitaria del ovino en Asturias: seroprevalencia de la enfermedad de la frontera, Maedi Visna, Aborto enzootico, Agalaxia contagiosa, Fiebre Q y Leptospirosis. XXVI Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC). Sevilla, España. 708-713.
- Exarchopoulos G. 1967. Pneumonia of sheep. Doctoral Thesis. School of Veterinary Medicine. Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki.
- Extramiana A.B., González L., Cortabarría N., García M., Juste R.A. 2002. Evaluation of a PCR technique for the detection of Maedi-Visna proviral DNA in blood, milk and tissue samples of naturally infected sheep. *Small Rumin Res* 44(2):109-118.
- Fan H. 2009. Retroviruses. In: *Encyclopedia of Microbiology*, 3rd Ed. Academic Press, Oxford. 519-534.
- Ferrer L.M. 1996. Control del Maedi-Visna en explotaciones ovinas extensivas con elevada seroprevalencia. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.

- Fevereiro M., Barros S., Fagulha T. 1999. Development of a monoclonal antibody blocking-ELISA for detection of antibodies against Maedi-Visna virus. *J Virol Methods* 81(1-2):101-108.
- Fieni F., Rowe J., Van Hoosear K., Burucoa C., Oppenheim S., Anderson G., Murray, J., BonDurant R. 2002. Presence of caprine arthritis–encephalitis virus (CAEV) infected cells in flushing media following oviductal-stage embryo collection. *Theriogenol* 57(2):931-940.
- Fridriksdottir V., Gunnarsson E., Sigurdarson S., Gudmundsdottir K.B. 2000. Paratuberculosis in Iceland: epidemiology and control measures, past and present. *Vet Microbiol* 77:263-267.
- Garrity R.R., Rimmelzwaan G., Minassian A., Tsai W.P., Lin G., De Jong J.J., Goudsmit J., Nara P.L. 1997. Refocusing neutralizing antibody response by targeted dampening of an immunodominant epitope. *J Immunol* 159(1):279-289.
- García I., Vega G.S., Asensio A., Agundo R., De la Fuente R. 1994. A serological survey of MVV in Comunidad de Madrid. 3rd European Society for Veterinary Virology (ESVV) congress. Interlaken, Suiza.
- Gates N.L., Everson D.O., Hulet C.V. 1977. Effects of thin ewe syndrome on reproductive efficiency. *J Am Vet Med Assoc* 171(12):1266-1267.
- Gates N.L., Winward L.D., Gorham J.R., Shen D.T. 1978. Serologic survey of prevalence of Ovine Progressive Pneumonia in Idaho range sheep. *J Am Vet Med Assoc* 173(12):1575-1577.
- Gendelman H.E., Narayan O., Molineaux S., Clements J.E., Ghotbi Z. 1985. Slow, persistent replication of lentiviruses: Role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 82(20):7086-7090.
- Gendelman H.E., Narayan O., Kennedy-Stoskopf S., Kennedy P.G., Ghotbi Z., Clements J.E., Stanley J., Pezeshkpour G. 1986. Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *J Virol* 58(1):67-74.
- Georgsson G., Nathanson N., Palsson P.A., Pétursson G. 1976. The pathology of Visna and Maedi in sheep. In: *Slow virus diseases of animals and man, frontiers in biology*. Kimberling R.H. Editor. North Holland Publishing Company, Amsterdam. 61-96.
- Georgsson G. 1990. Maedi-Visna: Pathology and pathogenesis. In: *Maedi-Visna and related diseases*. Pétursson G., Hoff-Jrgensen R. Editors. Kluwer Academic Publishers, Boston. 19-54.

- Giangaspero M., Gruner L., Nishikawa H., Tabbaa D. y Vacirca G. 1993. Lungworms, maedi visna and mixed infections with respiratory viruses in Syrian Awassi sheep. *Vet Res Commun* 17(5):371-374.
- Gil A., Rola M., Kuzmak J. 2006. Application of PCR technique in diagnosis of small ruminant lentivirus infection in sheep and goats. *Pol J Vet Sci* 9(4):213-217.
- Gjerset B., Jonassen C.M., Rimstad E. 2007. Natural transmission and comparative analysis of small ruminant lentiviruses in the Norwegian sheep and goat populations. *Virus Res* 125(2):153-161.
- Gjerset B., Rimstad E., Teige J., Soetaert K., Jonassen C.M. 2008. Impact of natural sheep-goat transmission on detection and control of small ruminant lentivirus group C infections. *Vet Microbiol* 135(3-4):231-238.
- Glaria I., Reina R., Crespo H., De Andrés X., Ramírez H., Biescas E., Pérez M.M., Badiola J., Luján L, Amorena B., De Andrés D. 2009. Phylogenetic analysis of SRLV sequences from an arthritic sheep outbreak demonstrates the introduction of CAEV-like viruses among Spanish sheep. *Vet Microbiol* 138(1-2):156-162.
- Gogolewski R.P., Adams D.S., McGuire T.C., Banks K.L., Cheevers W.P. 1985. Antigenic cross-reactivity between Caprine Arthritis-Encephalitis, Visna and Progressive Pneumonia Viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. *J Gen Virol* 66(6):1233-1240.
- González L., Badiola J.J., Gelabert J.L. 1984. Neumonía progresiva (Maedi) en el ganado ovino del País Vasco. *Med Vet* 1:277-282.
- González L. 1989a. El Maedi o Neumonía Progresiva en el conjunto de las enfermedades respiratorias crónicas del ganado ovino en la comunidad autónoma vasca. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- González L. 1989b. Lentivirus de los pequeños rumiantes: Maedi-Visna y Artritis Encefalitis Caprina.
- González L., Juste R.A., Cuervo L.A., Idigoras I., Saez de Ocariz C. 1993. Pathological and epidemiological aspects of the coexistence of Maedi-Visna and sheep pulmonary adenomatosis. *Res Vet Sci* 54(2):140-146.
- Gorrell M.D., Brandon M.R., Sheffer D., Adams R.J., Narayan O. 1992. Ovine lentivirus is macrophagetropic and does not replicate productively in T lymphocytes. *J Virol* 66(5):2679-2688.
- Greenwood P.L., North R.N., Kirkland P.D. 1995. Prevalence, spread and control of Caprine Arthritis-Encephalitis virus in dairy goat herds in new South Wales. *Aust Vet J* 72(9):341-345.

- Grego E., Profiti M., Giammarioli M., Giannino L., Rutili D., Woodall C., Rosati S. 2002. Genetic heterogeneity of small ruminant lentiviruses involves immunodominant epitope of capsid antigen and affects sensitivity of single-strain-based immunoassay. *Clin Diag Lab Immunol* 9(4):828-832.
- Grego E., Bertolotti L., Quasso A., Profiti M., Lacerenza D., Muz D., Rosati S. 2007. Genetic characterization of small ruminant lentivirus in Italian mixed flocks: evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. *J Gen Virol* 88(12):3423-3427.
- Grego E., Lacerenza D., Reina R., Profiti M., Rosati S. 2009. Serological characterization of the new genotype E of small ruminant lentivirus in roccaverano goat flocks. *Vet Res Commun* 33(1):137-140.
- Griffin D.E., Narayan O., Adams R.J. 1978. Early immune responses in Visna, a slow viral disease of sheep. *J Infect Dis* 138(3):340-350.
- Gudnadottir M. y Pálsson P.A. 1965. Host-virus interaction in Visna infected sheep. *J Immunol* 95(6):1116-1120.
- Gudnadottir M. y Kristinsdottir K. 1967. Complement-fixing antibodies in sera of sheep affected with Visna and Maedi. *J Immunol* 98(4):663.
- Gudnadottir M., Gislason G., Pálsson P.A. 1968. Studies on natural cases of Maedi in search for diagnostic laboratory methods. *Res Vet Sci* 9(1):65-67.
- Gudnadottir M. 1974. Visna-Maedi in sheep. *Prog. Med. Virol* 18:336-349.
- Haase A.T. 1986. Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature* 322:130-136.
- Herrmann-Hoesing L.M., White S.N., Mousel M.R., Lewis G.S., Knowles D.P. 2008. Ovine progressive pneumonia provirus levels associate with breed and Ovar-DRB1. *Immunogenetics* 60(12):749-758.
- Hoff-Jørgensen R. 1985. Control programme for lenti-virus infections in Danish sheep and goats. Brussels, Belgium: European Commission. Report nr 8076 EN. 133-137.
- Hönger D., Leitold B., Schuller W. 1990. Serological studies of antibodies against maedi-visna virus in sheep in Austria. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 103(2):39-41.
- Houwens D.J. y Gielkens A.L. 1979. An ELISA for the detection of Maedi/Visna antibody. *Vet Rec* 104(26):611.
- Houwens D.J., Gielkens A.L.J., Schaake J.J. 1982. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to Maedi-Visna virus. *Vet Microbiol* 7(3):209-219.

- Houwens D.J., König C.D., De Boer G.F., Schaake J. 1983. Maedi-Visna control in sheep I: Artificial rearing of colostrum-deprived lambs. *Vet Microbiol* 8:179-85.
- Houwens D.J., Schaake J.J., De Boer G.F. 1984. Maedi-Visna control in sheep II. Half-yearly serological testing with culling of positive ewes and progeny. *Vet Microbiol* 9(5):445-451.
- Houwens D.J. y Schaake J.J. 1987. An improved ELISA for the detection of antibodies to ovine and caprine lentiviruses, employing monoclonal antibodies in a one-step assay. *J Immunol Methods* 98(1):151-154.
- Houwens D.J. y Van Der Molen. 1987. A Five-Year Serological Study of Natural Transmission of Maedi-Visna Virus in a Flock of Sheep, Completed with Post Mortem Investigation. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 34:421-431.
- Houwens D.J., König C.D., Bakker J., De Boer M.J., Pekelder J.J., Sol J., Vellema P., De Vries G. 1987. Maedi-Visna control in sheep III: Results and evaluation of a voluntary control program in the Netherlands over a period of four years. *Vet Q* 9(1):29-36.
- Houwens D.J. y Nauta I.M. 1989. Immunoblot analysis of the antibody response to ovine lentivirus infections. *Vet Microbiol* 19(2):127-139.
- Houwens D.J. 1990. Economic importance, epidemiology and control. In: Maedi-Visna and related diseases. Pétursson G., Hoff-Jørgensen R. Editors. Kluwer Academic Publishers. 83-117.
- Hovden, A.O. 2001. The influence of CXCR4 on Maedi visna virus-induced syncytium formation. Master Thesis. The University of Bergen.
- Huffman E.M., Kirk J.H., Winward L., Gorham J.R. 1981. Serologic prevalence of Ovine Progressive Pneumonia in a western range flock of sheep. *J Am Vet Med Assoc* 178(7):708-710.
- Hüttner K., Seelmann M., Feldhusen F. 2010. Prevalence and risk factors for Maedi-Visna in sheep farms in Mecklenburg-Western-Pomerania. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 123(9-10):10-14.
- Johnson L.K., Meyer A.L., Zink M.C. 1992. Detection of ovine lentivirus in seronegative sheep by in situ hybridization, PCR, and cocultivation with susceptible cells. *Clin Immunol Immunopathol* 65(3):254-260.
- Juste R.A., Gelabert J.L., Sáez de Ocariz C. 1987. Aspectos epizootiologicos de algunas enfermedades del ganado ovino latxo en la CAPV: I-Metodología y enfermedades crónicas (Maedi y Paratuberculosis). ITEA, II Jornadas sobre producción animal 7:230-235.

- Juste R.A., Kwang J., De la Concha-Bermejillo A. 1998. Dynamics of cell-associated viremia and antibody response during the early phase of lentivirus infection in sheep. *Am J Vet Res* 59(5):563-568.
- Juste R.A., Ott T.L., Kwang J., Bazer F.W., De la Concha-Bermejillo A. 2000. Effects of recombinant ovine interferon (tau) on ovine lentivirus replication and progression of disease. *J Gen Virol* 81(2):525-532.
- Juste R. y De la Concha-Bermejillo A. 2001. Etiología del Maedi-Visna. *Ovis* 72:9-25.
- Juste R., Varea R., Monleón E. 2001. Diagnóstico del Maedi-Visna. *Ovis* 72:59-80.
- Kajikawa O., Lairmore M.D., DeMartini J.C. 1990. Analysis of antibody responses to phenotypically distinct lentiviruses. *J Clin Microbiol* 28(4):764-770.
- Karanikolaou K., Angelopoulou K., Papanastasopoulou M., Koumpati-Artopiou M., Papadopoulos O., Koptopoulos G. 2005. Detection of small ruminant lentiviruses by PCR and serology tests in field samples of animals from Greece. *Small Rumin Res* 58(2):181-187.
- Karl S.C. y Thormar H. 1971. Antibodies produced by rabbits immunized with Visna virus. *Infect Immun* 4(6):715-719.
- Karr B. M., Chebloune Y., Leung K., Narayan O. 1996. Genetic characterization of two phenotypically distinct North American ovine lentiviruses and their possible origin from caprine arthritis encephalitis virus. *Virology* 225:1-10.
- Katzman M. and Sudol M. 1994. In vitro activities of purified Visna virus integrase. *J Virol* 68(6):3558-3569.
- Keen J.E. 1994. The epidemiology of Ovine Progressive Pneumonia (ovine lentivirus): diagnosis, risk factor analysis, and production effects in sheep at the United States Meat Animal Research Center. Doctoral Thesis. University of Illinois, Urbana-Champaign.
- Keen J.E., Kwang J., Rosati S. 1995. Comparison of ovine lentivirus detection by conventional and recombinant serological methods. *Vet Immunol Immunopathol* 47(3-4):295-309.
- Keen J.E., Hungerford L.L., Wittum T.E., Kwang J., Littledike E.T. 1997a. Risk factors for seroprevalence of ovine lentivirus in breeding ewe flocks in Nebraska, USA. *Prev Vet Med* 30(2):81-94.
- Keen J.E., Hungerford L.L., Littledike E.T., Wittum T.E., Kwang J. 1997b. Effect of ewe ovine lentivirus infection on ewe and lamb productivity. *Prev Vet Med* 30(2):155-169.

- Kenigswald G. y Van-Straten M. 2009. The effect of maedi visna virus (MVV) positive serology on milk and meat production in Israeli "Assaf" sheep herd. 7th International Sheep Veterinary Congress. Norway.
- Kennedy R.C., Eklund C.M., Lopez C., Hadlow W.J. 1968. Isolation of a virus from the lungs of montana sheep affected with progressive pneumonia. *Virology* 35(3):483-484.
- Kennedy P.G., Narayan O., Ghotbi Z., Hopkins J., Gendelman H.E., Clements J.E. 1985. Persistent expression of Ia antigen and viral genome in Visna-Maedi virus-induced inflammatory cells. Possible role of lentivirus-induced interferon. *J Exp Med* 162(6):1970-1982.
- Kennedy-Stoskopf S., Narayan O., Strandberg J.D. 1985. The mammary gland as a target organ for infection with caprine arthritis-encephalitis virus. *J Comp Pathol* 95(4):609-617.
- Kennedy-Stoskopf S. y Narayan O. 1986. Neutralizing antibodies to Visna lentivirus: mechanism of action and possible role in virus persistence. *J Virol* 59(1):37-44.
- Kita J., Cutlip R.C., Kempski W., Sacks J. 1990. Survey for antibodies against maedi-visna in sheep in Poland. *Pol Arch Weter* 30(1-2):5-11.
- Kloosterman A., Frankena K., Ploeger H.W. 1989. Increased establishment of lungworms (*Dictyocaulus viviparus*) in calves after previous infections with gastrointestinal nematodes (*Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora*). *Vet Parasitol* 33:155-163.
- Kloosterman A., Ploeger H.W., Frankena K. 1990. Increased establishment of lungworms after exposure to a combined infection of *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora*. *Vet Parasitol* 36:117-122.
- Knowles D.P.J. 1997. Laboratory diagnostic tests for retrovirus infections of small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13(1):1-11.
- Koens H. 1943. De "zwoegers" op texel. Doctoral Thesis. Utrecht University.
- Kristbjörnsdóttir H.B., Andrésdóttir V., Svansson V., Svansson V., Torsteinsdóttir S., Matthíasdóttir S., Andrésson O.S. 2004. The vif gene of Maedi-Visna virus is essential for infectivity in vivo and in vitro. *Virology* 318(1):350-359.
- Krogsrud J. y Udnes H. 1978. Maedi (Progressive Interstitial Pneumonia in sheep). Diagnosis, epizootiology, prevention and control programme in Norway. *Bull Off Int Epizoot* 89:451-464.
- Kwang J. y Cutlip R. 1992. Detection of antibodies to ovine lentivirus using a recombinant antigen derived from the *env* gene. *Biochem Biophys Res Commun* 183(3):1040-1046.

- Kwang J., Keen J., Cutlip R.C., Littledike E.T. 1993. Evaluation of an ELISA for detection of Ovine Progressive Pneumonia antibodies using a recombinant transmembrane envelope protein. *J Vet Diagn Invest* 5(2):189-193.
- Kwang J. y Torres J.V. 1994. Oligopeptide-based enzyme immunoassay for ovine lentivirus antibody detection. *J Clin Microbiol* 32(7):1813-1815.
- Laamanen I., Jakava-Viljanen M., Sihvonen L. 2007. Genetic characterization of maedi-visna virus (MVV) detected in Finland. *Vet Microbiol* 122(3-4):357-365.
- Lacerenza D., Giammarioli M., Grego E., Marini C., Profiti M., Rutili D., Rosati S. 2006. Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant lentivirus genotypes. *Vet Immunol Immunopathol* 112(3-4):264-271.
- Lairmore M.D., Rosadio R.H., DeMartini J.C. 1986. Ovine lentivirus lymphoid interstitial pneumonia. Rapid induction in neonatal lambs. *Am J Pathol* 125(1):173-181.
- Lairmore M.D., Akita G.Y., Russell H.I., DeMartini J.C. 1987. Replication and cytopathic effects of ovine lentivirus strains in alveolar macrophages correlate with in vivo pathogenicity. *J Virol* 61(12):4038-4042.
- Lairmore M.D., Poulson J.M., Adducci T.A., DeMartini J.C. 1988. Lentivirus-induced lymphoproliferative disease. Comparative pathogenicity of phenotypically distinct ovine lentivirus strains. *Am J Pathol* 130(1):80-90.
- Lanusse C., Álvarez L., Sallovitz J., Mottier L., Sanchez Bruni S. 2009. Antinematodal Drugs. In: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Eds: Riviere J., Papich M. 9th Edition. Wiley-Blackwell (USA). Chapter 40:1053-1094.
- Lamara A., Fieni F., Mselli-Lakhal L., Chatagnon G., Bruyas J.F., Tainturier D., Battut I., Fomazero C., Chebloune Y. 2002. Early embryonic cells from in vivo-produced goat embryos transmit the caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Theriogenol* 58(6):1153-1163.
- Larruskain A., Minguíjon E., García-Etxebarria K., Moreno B., Arostegui I., Juste R.A., Jugo B.M. 2010. MHC class II DRB1 gene polymorphism in the pathogenesis of Maedi-Visna and pulmonary adenocarcinoma viral diseases in sheep. *Immunogenetics* 62(2):75-83.
- Larsen H.J., Hyllseth B., Krogsrud J. 1982. Experimental Maedi virus infection in sheep: Early cellular and humoral immune response following parenteral inoculation. *Am J Vet Res* 43(3):379-83.
- Lawrence D.T. 1990. *Atlas of diagnostic immunohistopathology*. Philadelphia: J.B Lippincott Company.

- Lechner F., Machado J., Bertoni G., Seow H.F., Dobbelaere D.A., Peterhans E. 1997a. Caprine Arthritis Encephalitis virus dysregulates the expression of cytokines in macrophages. *J Virol* 71(10):7488-7497.
- Lechner F., Vogt H.R., Seow H.F., Bertoni G., Cheevers W.P., Von Bodungen U., Zurbriggen A., Peterhans E. 1997b. Expression of cytokine mRNA in lentivirus-induced arthritis. *Am J Pathol* 151(4):1053-1065.
- Legastelois I., Cordier G., Cozon G., Cadoré J.L., Guiguen F., Greenland T., Mornex J.F. 1996. Visna-Maedi virus-induced expression of interleukin-8 gene in sheep alveolar cells following experimental in vitro and in vivo infection. *Res Virol* 147(2-3):191-197.
- Legastelois I., Cottin V., Levrey H., Mornex J. F., Cordier G. 1997. Contribution of proinflammatory cytokines to pulmonary phisiopathology in sheep following Visna-Maedi lentivirus infection. *Proceedings of the 3rd European Workshop on Ovine and Caprine Retroviruses*. Jaca, Spain.
- Leginagoikoa I., Daltabuit-Test M., Álvarez V., Arranz J., Juste R.A., Amorena B., De Andrés D., Luján L.L., Badiola J.J., Berriatua E. 2006a. Horizontal Maedi-Visna virus (MVV) infection in adult dairy-sheep raised under varying MVV-infection pressures investigated by ELISA and PCR. *Res Vet Sci* 80(2):235-241.
- Leginagoikoa I., Juste R.A., Barandika J., Amorena B., De Andrés D., Luján L., Badiola J., Berriatua E. 2006b. Extensive rearing hinders Maedi-Visna Virus (MVV) infection in sheep. *Vet Res* 37:767-778
- Leginagoikoa I., Minguijón E., Juste R.A., Barandika J., Amorena B., De Andrés D., Badiola J.J., Luján L., Berriatua E. 2010. Effects of housing on the incidence of Visna/Maedi virus infection in sheep flocks. *Res Vet Sci* 88(3):415-421.
- Leginagoikoa I. 2010. Epidemiología y diagnóstico de la infección por el virus Maedi Visna en diferentes sistemas de explotación ovinos españoles. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Legrottaglie R., Martini M., Barsotti G., Agrimi P. 1999. The effects of ovine lentivirus infection on some productive aspects in a sardinian sheep flock from Italy. *Vet Res Commun* 23(2):123-131.
- León L. y Prats J. 1996. Encuesta serológica de la infección por el virus de Maedi-Visna la población ovina de moratalla (Murcia). XXI Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC). Logroño, España. 119-127.
- Lerondelle C.T., Greenland M.J., Mornex J.F. 1995. Infection of lactating goats by mammary installation of cell-borne Caprine Arthritis-Encephalitis virus. *J Dairy Sci* 78(4):850-855.

- Lerondelle C., Godet M., Mornex J.F. 1999. Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. *Vet Res* 30(5):467-474.
- Leroux C., Chastang J., Greenland T., Mornex J.F. 1997. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: Existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Arch Virol* 142(6):1125-1137.
- Levy, J.A. 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Mol Biol Rev* 57(1):183-289.
- Liang K.Y. y Zeger S.L. 1986. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrics* 73:13-22.
- Light M.R., Schipper I.A., Molitor T.W., Tilton J.E., Slanger W.D. 1979. Progressive pneumonia in sheep: incidence of natural infection and establishment of clean flocks. *J Anim Sci* 49(5):1157-1160.
- List J. and Haase A.T. 1997. Integration of Visna virus DNA occurs and may be necessary for productive infection. *Virology* 237(2):189-197.
- Loman D.C. 1862. Het texels schaap. *Magazijn Voor Landbouw En Kruidkunde* 2:66-70.
- López C.M., Fernández G., Viña M., Cienfuegos S., Panadero R., Vázquez L., Díaz P., Pato J., Lago N., Dacal V. 2011. Protostrongylid infection in meat sheep from Northwestern Spain: prevalence and risk factors. *Vet Parasitol* 178:108-114.
- Lucam F. 1942. La bouhite ou lymphomatose pulmonaire maligne du mouton. *Réc Méd Vét* 118:273-284.
- Luján L., García Marín J.F., Fernández de Luco D., Vargas A., Badiola J.J. 1991. Pathological changes in the lungs and mammary glands of sheep and their relationship with Maedi-Visna infection. *Vet Rec* 129(3):51-54.
- Luján L., Badiola J., García Marín J., Moreno B., Vargas M., Fernández de Luco D., Pérez V. 1993. Seroprevalence of Maedi-Visna infection in sheep in the north-east of Spain. *Prev Vet Med* 15(2-3):181-190.
- Luján L., Begara I., Collie D.D.S., Watt N.J. 1994. Ovine lentivirus (Maedi-Visna virus) protein expression in sheep alveolar macrophages. *Vet Pathol* 31(6):695-703.
- Luján L., Begara I., Collie D.D.S., Watt N.J. 1995. CD8 lymphocytes in bronchoalveolar lavage and blood: in vivo indicators of lung pathology caused by Maedi-Visna virus. *Vet Immunol Immunopathol* 49(1-2):89-100.
- Luján L, Varea R, Vargas A, Badiola JJ, Gómez N, Bolea R, García-Marín JF. 2001a. Cuadro clínico y lesional (virus Maedi-Visna). *Ovis* 72:41-57.

- Luján L., Badiola J.J., Juste R.A., Berriatua E. 2001b. Epidemiología y control. El virus Maedi-Visna en España. *Ovis* 72:81-93.
- Lutley R., Pétursson G., Pálsson P.A., Georgsson G., Klein J., Nathanson N. 1983. Antigenic drift in Visna: virus variation during long-term infection of Icelandic sheep. *J Gen Virol* 64(7):1433.
- Lyall J.W., Solanky N., Tiley L.S. 2000. Restricted species tropism of Maedi-Visna virus strain EV-1 is not due to limited receptor distribution. *J Gen Virol* 81(12):2919-2927.
- Mahin L., Chadli M., Houwers D.J. 1984. A preliminary report on the occurrence of Maedi-Visna in sheep in Morocco. *Vet Q* 6(2):104-104.
- Marsh H. 1923. Progressive Pneumonia in sheep. *J Am Vet Med Assoc* 62(15):458-473.
- Martínez C., Díez-Baños P., Mezo M. 1989. Ritmos de eliminación larvaria de helmintos pulmonares en ovinos gallegos. VI Congreso Nacional y I Congreso Ibérico de Parasitología Ibérica. Cáceres. 218.
- Martínez C. 1992. Estudio epidemiológico de las nematodosis pulmonares ovinas en Galicia: influencia de las condiciones naturales y controladas sobre el desarrollo larvario de *Neostrongylus linearis* (Marotel, 1913) Gebauer, 1932 en *Cochicella barbara* L., 1758, infestada experimentalmente. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- McNeilly T.N., Baker A., Brown J.K., Collie D., Maclachlan G., Rhind S.M., Harkiss G.D. 2008. Role of alveolar macrophages in respiratory transmission of Visna/maedi virus. *J Virol* 82(3):1526-1536.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 2012. Caracterización del sector ovino y caprino en España. Dirección General de recursos agrícolas y ganaderos.
- Mohri M., Seifi H.A., Zamani Sani S.H. 2005. Effects of oral administration of levamisole on non-specific immunity, serum proteins and health in normal colostrum-fed neonatal dairy calves. *Comp Clin Path* 13:132-136.
- Mornex J.F., Lena P., Loire R., Cozon G., Greenland T., Guigen F., Jacquier M.F., Cordier G. 1994. Lentivirus-induced interstitial lung disease: pulmonary pathology in sheep naturally infected by the visna-maedi virus. *Vet Res* 25(5):478-488.
- Morrondo P., Díez-Baños P., Cabaret J. 1992. Influence of dessication of faeces in survival and infectivity of first-stage larvae of *Muellerius capillaris* and *Neostrongylus linearis*. *J Helminthol* 66:213-219.

- Morrondo P., Díez-Baños P., Panadero R., López C. 1999. Nematodosis pulmonares de los pequeños rumiantes. *Inf Vet* 99:41-48.
- Mseli-Lakhal L., Guiguen F., Fornazero C., Du J., Favier C., Durand J., Grezel D., Balleydier S., Mornex J.F., Chebloune Y. 1999. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. *Virology* 259(1):67-73.
- Mullis K.B. 1994. The polymerase chain-reaction (nobel lecture). *Angew Chem-Int Edit Engl* 33(12):1209-1213.
- Narayan O., Griffin D.E., Silverstein A.M. 1977. Slow virus infection: replication and mechanisms of persistence of Visna virus in sheep. *J Infect Dis* 135(5):800-806.
- Narayan O., Clements J.E., Griffin D.E., Wolinsky J.S. 1981. Neutralizing antibody spectrum determines the antigenic profiles of emerging mutants of Visna virus. *Infect Immun* 32(3):1045-1050.
- Narayan O., Kennedy-Stoskopf S., Sheffer D., Griffin D.E., Clements J.E. 1983. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infect Immun* 41(1):67-73.
- Narayan O. y Cork L.C. 1985. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. *Rev Infect Dis* 7(1):89-98.
- Narayan O. y Clements J.E. 1989. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J Gen Virol* 70(7):1617-1639.
- Narayan O., Zink M., Gorrell M., Crane S., Huso D., Jolly P., Saltarelli M., Adams R., Clements J.E. 1993. The lentiviruses of sheep and goats. *The Retroviridae*. Plenum Press. New York. 229-256.
- OIE. 2008. Artritis/encefalitis caprina y Maedi-Visna. En: Manual de la OIE sobre animales terrestres. Capítulos 2.7.3. y 2.7.4. <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/>.
- Oliver R.E., Gorham J.R., Parish S.F., Hadlow W.J., Narayan O. 1981a. Ovine Progressive Pneumonia: pathologic and virologic studies on the naturally occurring disease. *Am J Vet Res* 42(9):1554-1559.
- Oliver R.E., Gorham J.R., Perryman L.E, Spencer G.R. 1981b. Ovine Progressive Pneumonia: experimental intrathoracic, intracerebral, and intra-articular infections. *Am J Vet Res* 42(9):1560-1564.
- Ouzrout R. y Lerondelle C. 1990. Expression du virus Visna-Maedi dans les sécrétions mammaires d'une brebis séropositive lors d'une gestation puis d'une induction artificielle de lactation. *Ann Rech Vét* 21:69-73.

- Ozyoruk F., Cheevers W.P., Hullinger G.A., McGuire T.C., Hutton M., Knowles D.P. 2001. Monoclonal antibodies to conformational epitopes of the surface glycoprotein of caprine arthritis-encephalitis virus: potential application to competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in goat sera. *Clin Vaccine Immunol* 8(1):44-51.
- Palfi V., Glavits R., Hajtos I. 1989. Testicular lesions in rams infected by Maedi/Visna virus. *Acta Vet Hung* 37(1-2):97-102.
- Pálsson P.A. 1962. Paratuberculosis in Icelandic sheep and its control by vaccination. *Bull Off Int Epizoot* 58:65-79.
- Pálsson P.A. 1976. Maedi and Visna in sheep. *Front Biol* 44:17-43.
- Pancino G., Ellerbrok H., Sitbon M., Sonigo P. 1994. Conserved framework of envelope glycoproteins among lentiviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 188:77-105.
- Pasick J. 1998. Maedi-Visna virus and caprine arthritis-encephalitis virus: distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. *Can J Vet Res* 62(4):241-244.
- Pedersen N.C., Yamamoto J.K., Ishida T., Hansen, H. 1989. Feline immunodeficiency virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 21(1):111-129.
- Pedreira J., Paz-Silva A., Sánchez-Andrade R., Suárez J.L., Arias M., Lomba C., Díaz P., López C., Díez-Baños P., Morondo P. 2006. Prevalences of gastrointestinal parasites in sheep and parasite-control practices in NW Spain. *Prev Vet Med* 75(1-2):56-62.
- Pekelder J.J., Veenink G.J., Akkermans J.P., Van Eldik P., Elving L., Houwers D.J. 1994. Ovine lentivirus induced indurative lymphocytic mastitis and its effect on the growth of lambs. *Vet Rec* 134(14):348-350.
- Peluso R., Haase A.T., Stowring L., Edwards M., Ventura P. 1985. A Trojan Horse mechanism for the spread of Visna virus in monocytes. *Virology* 147:231-236.
- Penning P.D. y Gibb M.J. 1979. The effect of milk intake on the intake of cut and grazed herbage by lambs. *Anim Sci* 29(1):53-67.
- Pepin M., Vitu C., Russo P., Mornex J.F., Peterhans E. 1998. Maedi-Visna virus infection in sheep: A review. *Vet Res* 29(3-4):341-367.
- Perdigones, M.N. 2004. Seguimiento de la infección por el Virus de Maedi Visna en una explotación de ganado ovino. Memoria de Licenciatura. Universidad Complutense.

- Pérez M., Biescas E., De Andrés X., Leginagoikoa I., Salazar E., Berriatua E., Reina R., Bolea R., De Andrés D., Juste R.A., Cancer J., Gracia J., Amorena B., Badiola J.J., Luján L. 2010. Visna/Maedi virus serology in sheep: survey, risk factors and implementation of a successful control programme in Aragón (Spain). *Vet J* 186(2):221-225
- Perk K. 1995. Characteristics of ovine and caprine lentivirus infections. *Leukemia* 9 (1):98-100.
- Peterhans E., Greenland T., Badiola J., Harkiss G., Bertoni G., Amorena B., Eliasiewicz M., Juste R.A., Krassnig R., Lafont J.P., Lenihan P., Pétursson G., Pritchard G., Thorley J., Vitu C., Mornex J.F., Pepin M. 2004. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet Res* 35(3):257-274.
- Peterson K., Brinkhof J.M., Houwers D.J., Colenbrander B., Gadella B.M. 2007. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenol* 69(4):433-442
- Pétursson G., Georgsson G., Pálsson P.A. 1990. Maedi-visna virus. In: *Virus infections of ruminants*. Dinker Z., Morein B. Editors. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 431-440.
- Pétursson G., Turelli P., Matthíasdóttir S., Georgsson G., Andrésson Ó.S., Torsteinsdóttir S., Vigne R., Andréddóttir V., Gunnarsson E., Agnarsdóttir G. 1998. Visna virus dUTPase is dispensable for neuropathogenicity. *J Virol* 72 (2):1657-1661.
- Pisoni G., Quasso A., Moroni P. 2005. Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: Evidence for natural transmission from goats to sheep. *Virology* 339(2):147-152.
- Pisoni G., Bertoni G., Puricelli M., Maccalli M., Moroni P. 2007a. Demonstration of coinfection with and recombination by caprine arthritis-encephalitis virus and maedi-visna virus in naturally infected goats. *J Virol* 81(10):4948-4955.
- Pisoni G., Moroni P., Turin L., Bertoni G. 2007b. Compartmentalization of small ruminant lentivirus between blood and colostrum in infected goats. *Virology* 369(1):119-130.
- Power C., Richardson S., Briscoe M., Pasick J. 1995. Evaluation of two recombinant Maedi-Visna virus proteins for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to ovine lentiviruses. *Clin Vaccine Immunol* 2(5):631-633.
- Prats J. y León L. 1994. Encuesta inmunológica de maedi en la población ovina de Caravaca (Murcia). XIX jornadas científicas de la sociedad española de ovinotecnia y caprinotecnia (SEOC). Burgos, España.

- Preziuso S., Taccini E., Rossi G., Renzoni G., Braca G. 2003. Experimental Maedi Visna Virus Infection in sheep: a morphological, immunohistochemical and PCR study after three years of infection. *Eur J Histochem* 47(4):373-378.
- Preziuso S., Renzoni G., Allen T.E., Taccini E., Rossi G., DeMartini J.C., Braca G. 2004. Colostral transmission of maedi visna virus: sites of viral entry in lambs born from experimentally infected ewes. *Vet Microbiol* 104:157-164.
- Preziuso S., Or M.E., Giammarioli M., Kayar A., Feliziani F., Gonul R., Farneti S., Yaramis C.P., Valente C., Cuteri V. 2010. Maedi-visna virus in Turkish sheep: a preliminary serological survey using ELISA tests. *Turk J Vet Anim Sci* 34(3):289-293.
- Pritchard G.C. y Done S.H. 1990. Concurrent Maedi-Visna virus infection and pulmonary adenomatosis in a commercial breeding flock in East Anglia. *Vet Rec* 127(8):197-200.
- Pritchard G.C. y Dawson M. 2000. Maedi-Visna. In: *Diseases of sheep*. 3rd Edition. Martin W.B., Aitken I.D. Editors. Blackwell. 187-191.
- Quérat G., Barban V., Sauze N., Filippi P., Vigne R., Russo P., Vitu C. 1984. Highly lytic and persistent lentiviruses naturally present in sheep with progressive pneumonia are genetically distinct. *J Virol* 52(2):672-679.
- Radostits O.M., Arundel J.H., Gay C.C., Blood D.C., Hinchcliff K.W. 2000. *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. 9th Edition. WB Saunders Company Editors. London.
- Rajan S.S. y Sokal D. 2010. A simpler tool for estimation of HIV incidence from cross-sectional, age-specific prevalence data. *J Epidemiol Community Health* 65:111-115.
- Ramírez H., Roman B.S., Glaria I., Reina R., Hernández M.M., De Andrés X., Crespo H., Hichou B., Cianca S., Goni C., Grandas A., García-Pastor L., Vijil L.E., Quintín F., Grillo M.J., De Andrés D., Amorena B. 2009. Antibody-based diagnosis of small ruminant lentivirus infection in seminal fluid. *Theriogenol* 72(8):1085-1096.
- Ravazzolo A.P., Nenci C., Vogt H.R., Waldvogel A., Obexer-Ruff G., Peterhans E., Bertoni G. 2006. Viral load, organ distribution, histopathological lesions and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology* 350(1):116-127.
- Reina R., Mora M.I., Glaria I., García I., Solano C., Luján L., Badiola J.J., Contreras A., Berriatua E., Juste R., Mamoun R.Z., Rolland M., Amorena B., De Andrés D. 2006. Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Res* 121:189-198.

- Reina R., Berriatua E., Luján L.L., Juste R.A., Sánchez A., De Andrés D., Amorena B. 2009. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: An update. *Vet J* 182(1):31-37
- Reina R., Bertolotti L., Dei Giudici S., Puggioni G., Ponti N., Profiti M., Patta C., Rosati S. 2010. Small ruminant lentivirus genotype E is widespread in Sarda goat. *Vet Microbiol* 144:24-31.
- Regassa A., Toyeb M., Abebe R., Megersa B., Mekibib B., Mekuria S., Debela E., Abunna F. 2010. Lungworm infection in small ruminants: prevalence and associated risk factors in Dessie and Kombolcha districts, northeastern Ethiopia. *Vet Parasitol* 169:144-148.
- Ressang A.A., De Boer G.F., De Wijn G.C. 1968. The lung in zwoegerziekte. *Pathol Vet* 5(4):353-369.
- Reviriego F.J. 1998. Seroprevalencia de Maedi-Visna y artritis encefalitis caprina. Estudio realizado en la provincia de ávila. *Albéitar* 21:15.
- Reyburn H.T., Roy D.J., Blacklaws B.A., Sargan D.R., McConnell I. 1992a. Expression of Maedi-Visna virus major core protein, p25: Development of a sensitive p25 antigen detection assay. *J Virol Methods* 37(3):305-320.
- Reyburn H.T., Roy D.J., Blacklaws B.A., Sargan D.R., Watt N.J., McConnell I. 1992b. Characteristics of the T cell-mediated immune response to Maedi-Visna virus. *Virology* 191(2):1009-1012.
- Rimstad E., East N.E., Torten M., Higgins J., DeRock E., Pedersen N.C. 1993. Delayed seroconversion following naturally acquired Caprine Arthritis-Encephalitis virus infection in goats. *Am J Vet Res* 54(11):1858-1862.
- Ringler D.J., Hunt R.D., Desrosiers R.C., Daniel M.D., Chalifoux L.V., King N.W. 1988. Simian immunodeficiency virus induced meningoencephalitis: natural history and retrospective study. *Ann Neurol* 23(1):101-107.
- Robles C.A., Layana J.A., Cabrera R.F., Raffo F., Cutlip R.C. 2003. Estudio serológico retrospectivo de Maedi (Neumonía Progresiva) en ovinos y de Artritis-Encefalitis en caprinos de Patagonia, Argentina. *Revista de Medicina Veterinária* 84(3):96-99.
- Rosati S., Kwang J., Keen J.E. 1995. Genome analysis of North American small ruminant lentiviruses by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Vet Diagn Investig* 7(4):437-443.
- Rowe J.D., East N.E., Franti C.E., Thurmond M.C., Pedersen N.C., Theilen G.H. 1992. Risk factors associated with the incidence of seroconversion to caprine arthritis-encephalitis virus in goats on California dairies. *Am J Vet Res* 53(12):2396-2403.

- Roy D.J., Watt N.J., Ingman T., Houwers D.J., Sargan D.R., McConnell I. 1992. A simplified method for the detection of Maedi-Visna virus RNA by in situ hybridization. *J Virol Methods* 36(1):1-11.
- Ruff G., Regli J.G., Lazary S. 1993. Occurrence of caprine leucocyte class I and II antigens in saanen goats affected by Caprine Arthritis (CAE). *Int J Immunogenet* 20(4):285-8.
- Salazar E., Monleon E., Bolea R., Acin C., Pérez M., Álvarez N., Leginagoikoa I., Juste R.A., Minguñon E., Reina R., Glaria I., Berriatua E., De Andrés D., Badiola J.J., Amorena B., Luján L. 2010. Detection of PrP(Sc) in lung and mammary gland is favored by the presence of Visna/maedi virus lesions in naturally coinfecting sheep. *Vet Res* 41(5):58-68.
- Salvatori D., Vincenzetti S., Maury G., Gosselin G., Gaubert G., Vita A. 2001. Maedi-Visna virus, a model for in vitro testing of potential anti-HIV drugs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 24(2):113-122.
- Saman E., Van Eynde G., Luján L., Extramiana B., Harkiss G., Tolari F., González L., Amorena B., Watt N., Badiola J. 1999. A new sensitive serological assay for detection of lentivirus infections in small ruminants. *Clin Vaccine Immunol* 6(5):734-740.
- Sargan D.R., Sutton K.A., Bennet I.D., McConnell I., Harkiss G.D. 1995. Sequence and repeat structure variants in the long terminal repeat of Maedi-Visna virus EV1. *Virology* 208(1):343-348.
- Savey M., Espinasse J., Parodi A.L. 1981. Maedi: clinical disease and pathological confirmation in France. *Vet Rec* 109(3):65.
- Seimenis A., Papadopoulos C., Mastroianni M., Mangana O. 1982. Slow virus diseases of sheep in Greece. In: *Slow Viruses in Sheep, Goats and Cattle*. Sharp J.M., Hoff-Jorgensen R. Editors. *Comiss Europ Commun.* 105-110.
- Seimenis A., Mastroianni M., Mangana O., Despotopoulos A. 1983. Slow virus diseases of sheep in Greece. In: *Laboratory Diagnosis of Sheep Progressive Pneumonia (Maedi) in Greece*. Sharp J.M., Hoff-Jorgensen R. Editors. *Comiss Europ Commun.* 305-309.
- Scheer-Czechowski P., Vogt H.R., Tontis A., Peterhans E., Zanoni R. 2000. Pilot project for eradicating Maedi-Visna in walliser blacknose sheep. *Schweiz Arch Tierheilkd* 142(4):155-164.
- Seffner W. y Lippmann R. 1967. Zum Vorkommen einer progressiv verlaufenden interstitiellen Pneumonie der Schafe. *Mh Vet Med* 22:901-906.
- Shah C., Boni J., Huder J.B., Vogt H.R., Muhlherr J., Zanoni R., Miserez R., Lutz H., Schupbach J. 2004a. Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and

- ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Virology*, 319(1):12-26.
- Shah C., Huder J.B., Boni J., Schonmann M., Muhlherr J., Lutz H., Schupbach J. 2004b. Direct evidence for natural transmission of small-ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and vice versa. *J Virol* 78(14):7518-7522.
- Shuaib M., Green C., Rashid M., Duizer G., Whiting T.L. 2010. Herd risk factors associated with sero-prevalence of Maedi-Visna in the Manitoba sheep population. *Can Vet J* 51(4):385-390.
- Sigurdardóttir B. y Thormar H. 1964. Isolation of a viral agent from the lungs of sheep affected with Maedi. *J Infect Dis* 114(1):55-60.
- Sigurdsson B., Grímsson H., Pálsson P.A. 1952. Maedi, a chronic, progressive infection of sheep's lungs. *J Infect Dis* 90(3):233-41.
- Sigurdsson B., Pálsson P.A., Tryggvadóttir A. 1953. Transmission experiments with Maedi. *J Infect Dis* 93(2):166-75.
- Sigurdsson B. 1954. Maedi, a slow progressive pneumonia of sheep: An epizootological and a pathological study. *Br Vet J* 110:225-270.
- Sigurdsson B., Pálsson P.A., Grímsson H. 1957. Visna, a demyelinating transmissible disease of sheep. *J Neuropath Exp Neurol* 16(3):390-403.
- Sigurdsson B. y Pálsson P.A. 1958. Visna of sheep: a slow, demyelinating infection. *Br J Exp Pathol* 39(5):519-528.
- Sigurdsson B., Thormar H., Pálsson P.A. 1960. Cultivation of Visna virus in tissue culture. *Arch Virol* 10(3):368-381.
- Sihvonen L. 1980. Studies on transmission of Maedi virus to lambs. *Acta Vet Scand* 21(4):689-698.
- Sihvonen L., Estola T., Tuomi J. 1980a. Experimental Maedi infection in sheep: Detection of virus, clinical course, histopathology. *Acta Vet Scand* 21(1):113-123.
- Sihvonen L., Estola T., Tuomi J. 1980b. Experimental Maedi infection in sheep: Antibody response. *Acta Vet Scand* 21(1):124-133.
- Sihvonen L. 1981. Early immune responses in experimental Maedi. *Res Vet Sci* 30(2):217-222.
- Sihvonen L. y Veijalainen P. 1981. Kinetics of Maedi virus production in sheep choroid plexus cells. *Vet Microbiol* 6(1):1-8.

- Sihvonen L. 1984. Late immune responses in experimental Maedi. *Vet Microbiol* 9(3):205-213.
- Sihvonen L., Hirvelä-Koski V., Nuotio L., Kokkonen U.M. 1999. Serological survey and epidemiological investigation of maedi-visna in sheep in Finland. *Vet Microbiol* 65(4):265-270.
- Simard C.L. y Briscoe M.R. 1990. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to Maedi-Visna virus in sheep II. Comparison to conventional agar gel immunodiffusion test. *Can J Vet Res* 54(4):451.
- Simard C. y Morley R.S. 1991. Seroprevalence of Maedi-Visna in canadian sheep. *Can J Vet Res* 55(3):269-456.
- Smith C. 1992. Ovine lentivirus: A real or imagined threat? *J Am Vet Med Assoc* 200(2):139-143.
- Snowder G.D., Gates N.L., Glimp H.A., Gorham J.R. 1990a. Prevalence and effect of subclinical Ovine Progressive Pneumonia virus infection on ewe wool and lamb production. *J Am Vet Med Assoc* 197(4):475-479.
- Snowder G.D., Glimp H.A., Gates N.L., Gorham J.R. 1990b. Analysis of milk production and composition in ewes seropositive and seronegative for Ovine Progressive Pneumonia virus. *Sheep Res J* 6:24-28.
- Snowder G.D., Gates N.L., Glimp H.A., Knowles D.P. 1991. The effect of production trait selection over 10 years on the seroprevalence of Ovine Progressive Pneumonia virus in a closed flock. *Sheep Res J* 7:24-28.
- Snyder S.P., DeMartini J.C., Ameghino E., Caletti E. 1983. Coexistence of Pulmonary Adenomatosis and Progressive Pneumonia in sheep in the central sierra of Peru. *Am J Vet Res* 44(7):1334-1338.
- Sotelo J.M., Gutiérrez A., Fernández M., Cármenes P., Muñoz M. 1995. Seroprevalencia de la infección por lentivirus en ganado ovino y caprino de la provincia de León. IV congreso nacional de virología. Madrid.
- Stevenson R.G. y Bouffard A. 1984. Chronic Viral Respiratory Diseases of Sheep. *Can Vet J* 25:34-51.
- Stowring L., Haase A.T., Pétursson G., Georgsson G., Pálsson P., Lutley R., Roos R., Szuchet S. 1985. Detection of Visna virus antigens and RNA in glial cells in foci of demyelination. *Virology* 141(2):311-315.
- Straub O.C. 1970. Über die Isolierung von Maedi/Visna-Virus (MVV) aus einem deutschen Schafbestand. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 83:357-360.

- Straub O.C. 1983. Transmission studies of Maedi/Visna in sheep. Luxemburgo, Commission of the European Community. Report nr EUR 8076 EN. 87.
- Straub O.C. 1985. Transmission studies of Maedi/visna in sheep. In: Slow Viruses in Sheep, goats and cattle. Commission of the European Communities. Luxemburgo. 87-91.
- Straub O.C. 2004. Maedi–Visna virus infection in sheep. History and present knowledge. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27:1-5
- Thormar H. 1961. Stability of Visna virus in infectious tissue culture fluid. *Arch Virol* 10(4):501-509.
- Thormar H. 1965. A comparison of Visna and Maedi viruses I: physical, chemical and biological properties. *Res Vet Sci* 6:117-129.
- Thormar H., Barshatzky M.R., Arnesen K., Kozlowski P.B. 1983. The emergence of antigenic variants is a rare event in long-term Visna virus infection in vivo. *J Gen Virol* 64(7):1427-1432.
- Thrusfield M. 2005. *Veterinary Epidemiology*. 3rd Edition. Blackwell Science.
- Tizard I.R. 2009. *Veterinary immunology*. 8th Edition. Saunders Elsevier.
- Toft N., Åkerstedt J., Tharaldsen J., Hopp P. 2007. Evaluation of three serological tests for diagnosis of Maedi-Visna virus infection using latent class analysis. *Vet Microbiol* 120:77-86.
- Tolari F. 2000. Maedi Visna in sheep. Etiology, diagnosis, prevention and eradication. *Summa* 8:23.
- Torfason E.G., Gudnadottir M., Löve A. 1992. Comparison of immunoblots with neutralizing and complement fixing antibodies in experimental and natural cases of Visna-Maedi. *Arch Virol* 123(1):47-58.
- Travassos C., Benoit C., Valas S., da Silva A., Perrin G. 1998. Detection of Caprine Arthritis Encephalitis virus in sperm of experimentally infected bucks. *Vet Res* 29(6):579-584.
- Tuboly S., Glavits R., Megyeri Z., Palfi V. 1991. Immune reactions and immunopathologic changes induced in ovine fetuses and lambs by Maedi-Visna virus. *Acta Vet Hung* 39(3-4):139-147.
- Turelli P., Pétursson G., Guiguen F., Mornex J.F., Vigne R., Querat G. 1996. Replication properties of dUTPase-deficient mutants of caprine and ovine lentiviruses. *J Virol* 70:1213-1217.

- Turelli P., Guiguen F., Mornex J.F., Vigne R., Quérat G. 1997. dUTPase-minus caprine arthritis-encephalitis virus is attenuated for pathogenesis and accumulates G-to-A substitutions. *J Virol* 71(6):4522-4530.
- USDA. 2003. Ovine Progressive Pneumonia: Awareness, Management, and Seroprevalence. Info Sheet. APHIS-Veterinary Services-Centers for Epidemiology and Animal Health.
- Van Der Molen E.J., Vecht U., Houwers D.J. 1985. A chronic indurative mastitis in sheep, associated with Maedi/Visna virus infection. *Vet Q* 7(2):112-119.
- Van Maanen C., Brinkhof J.M., Moll L., Colenbrander B., Houwers D.J. 2010. Aspects of the epidemiology, research, and control of lentiviral infections of small ruminants and their relevance to Dutch sheep and goat farming. *Tijdschr Diergeneeskd* 135(16):600-603.
- Vander S.J., Bradway D.S., Besser T.E., Evermann J.F. 1994. Evaluation of a kinetic enzyme-linked immunosorbent assay for detection of caprine arthritis-encephalitis virus-specific antibodies. *J Vet Diagn Invest* 6(1):30-33.
- Varea R., Monleon E., Pacheco C., Luján L., Bolea R., Vargas M.A., Van Eynde G., Saman E., Dickson L., Harkiss G. 2001. Early detection of Maedi-Visna (Ovine Progressive Pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. *J Vet Diagn Invest* 13(4):301-307.
- Vitu C., Russo P., Filippi P., Vigne R., Querat G., Giauffret A. 1982. Une technique ELISA pour la detection des anticorps anti-virus Maedi-Visna. Etude comparative avec l'immunodiffusion en gelose et la fixation du complemen. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 5(4):469-481.
- Vogt H. R., Bertoni G., Hertig C., Stalder H. P., Zanoni R., Peterhans E. 1999. The interlaken goat and sheep show mystery: highly clustered seroconversions to SRLV in a swiss breed of goats in the final stage of the CAE eradication program. Meeting of WG2 and WG4 of the COST Action 834, Pisa.
- Wagter L.H.A., Jansen A., Bleumink-Pluym N.M.C., Lenstra J.A., Houwers D.J. 1998. PCR detection of lentiviral *gag* segment DNA in the white blood cells of sheep and goats. *Vet Res Commun* 22(5):355-362.
- Watt N.J., MacIntyre N., Collie D., Sargan D., McConnell I. 1992. Phenotypic analysis of lymphocyte populations in the lungs and regional lymphoid tissue of sheep naturally infected with Maedi Visna virus. *Clin Exp Immunol* 90(2):204-208.
- Winward L.D., Leendertsen L., Shen D.T. 1979. Microimmunodiffusion test for diagnosis of Ovine Progressive Pneumonia. *Am J Vet Res* 40(4):564-566.
- Woodall C.J., Maclaren L.J., Watt N.J. 1997. Differential levels of mRNAs for cytokines, the interleukin-2 receptor and class II DR/DQ genes in ovine

- interstitial pneumonia induced by Maedi Visna virus infection. *Vet Pathol* 34(3):204-211.
- Woodward T.M., Carlson J.O., De la Concha-Bermejillo A., DeMartini J.C. 1995. Biological and genetic changes in ovine lentivirus strains following passage in isogeneic twin lambs. *J Acquired Immune Defic Syndromes* 8(2):124-133.
- Yilmaz H., Gurel A., Turan N., Bilal T., Kuscu B., Dawson M.M., Morgan K.L. 2002. Abattoir study of Maedi-Visna virus infection in Turkey. *Vet Rec* 151:358-360.
- Zanoni R., Pauli U., Peterhans E. 1990. Detection of Caprine Arthritis-Encephalitis and Maedi-Visna viruses using the polymerase chain reaction. *Cell Mol Life Sci* 46(3):316-319.
- Zanoni R.G., Nauta I.M., Pauli U., Peterhans E. 1991. Expression in escherichia coli and sequencing of the coding region for the capsid protein of dutch Maedi-Visna virus strain ZZV 1050: Application of recombinant protein in enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of caprine and ovine lentiviruses. *J Clin Microbiol* 29(7):1290-1294.
- Zanoni R., Nauta I., Kuhnert P., Pauli U., Pohl B., Peterhans E. 1992. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses detected by PCR. *Vet Microbiol* 33(1-4):341-351.
- Zanoni R.G., Vogt H.R., Pohl B., Böttcher J., Bommeli W., Peterhans E. 1994. An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to Small ruminant lentiviruses. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 41(1-10):662-669.
- Zanoni R.G. 1998. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *J Gen Virol* 79:1951-1961.
- Zhang Z., Harkiss G.D., Hopkins J., Woodall C.J. 2002. Granulocyte macrophage colony stimulating factor is elevated in alveolar macrophages from sheep naturally infected with Maedi-Visna virus and stimulates Maedi-Visna virus replication in macrophages in vitro. *Clin Exp Immunol* 129(2):240-246.
- Zink M.C., Narayan O., Kennedy P.G.E., Clements J.E. 1987. Pathogenesis of Visna/Maedi and Caprine Arthritis-Encephalitis: new leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. *Vet Immunol Immunopathol* 15(1-2):167-180.
- Zink M.C. y Johnson L.K. 1994. Pathobiology of lentivirus infections of sheep and goats. *Virus Res* 32(2):139-154.

